

TURJAF

12(S2): 2024



SPECIAL ISSUE BY

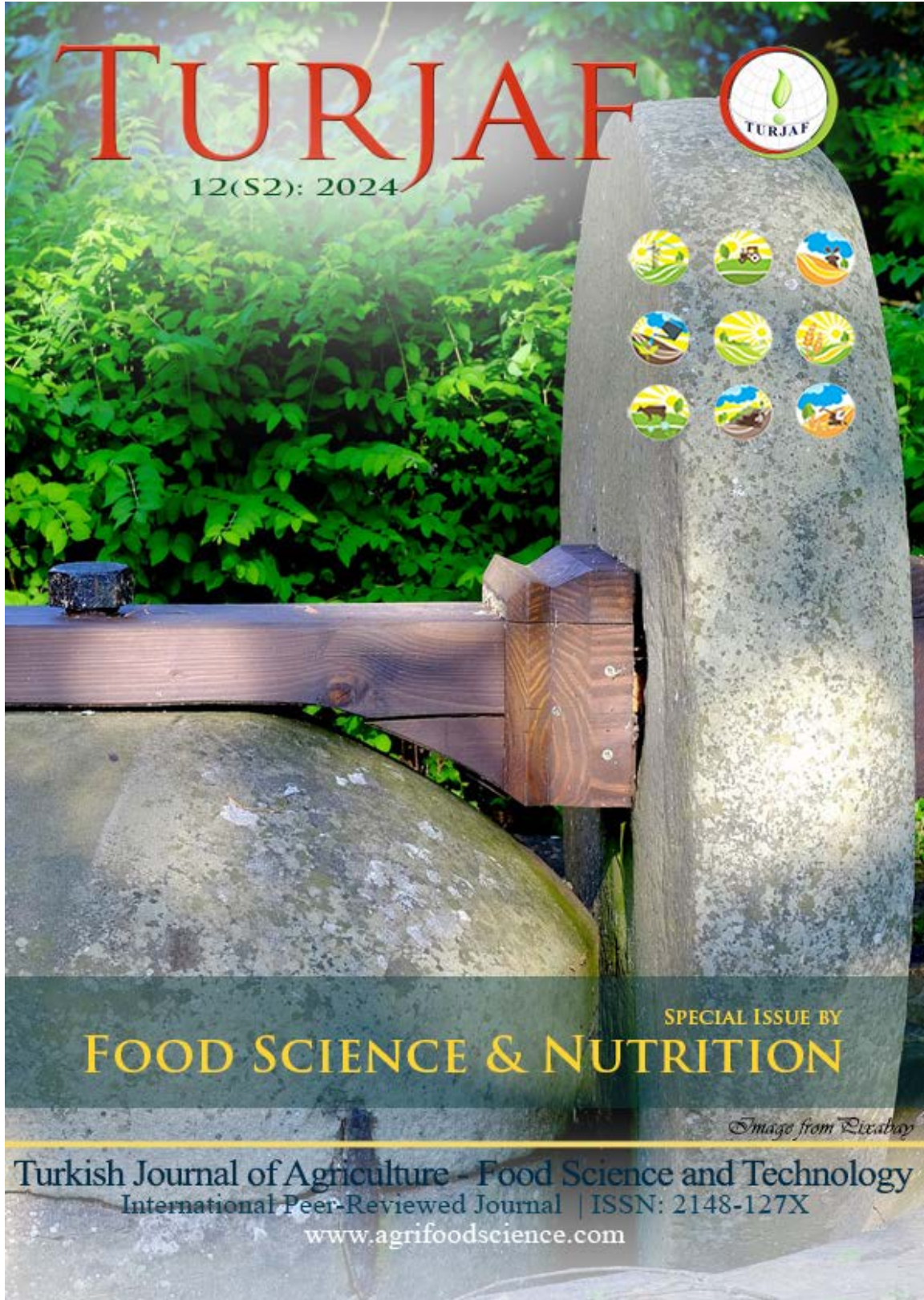
FOOD SCIENCE & NUTRITION

Image from Pixabay

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology

International Peer-Reviewed Journal | ISSN: 2148-127X

www.agrifoodscience.com





Vol. 12 No. s2 (2024): Special Issue by Food Science & Nutrition

Research Paper

Potential of Nisin and Newly Discovered Bacteriocins as Preservatives for Pasteurised Milk

Getrude Okiko, Ivan Sugrue, Fredrick O. Ogutu, Paul Ross 2196-2205

Detection of Pea and Spinach Adulteration in Pistachio Nuts using a Low-Cost Spectral Sensor

Beyza Türköz, Muhammed Mustafa Özçelik, Sebahattin Serhat Turgut 2206-2215

The Concept of Edible Insect and its Use in Bakery Products: Investigation of Sensory Quality of Cookies Containing Edible Locust (*Locusta migratoria*)

Servet Kazım Güney, İrem Bedir, Emre Sarıal 2216-2221

The Determinants of Recall Event Timing of Contaminated Frozen Poultry Products in Retail Outlets in North-Central Nigeria

Emeka Solomon Fidelis; Moradeyo Adebajo Otitoju, Park Odojoma Idisi, Ugochukwu Emmanuel Anazo, David 2222-2233

On The Pros and Cons of Using Excel for Regression Analysis

Sencer Buzrul 2234-2241

Investigation of Knowledge, Attitudes and Behaviours of University Students/Consumers About Organic Animal Products

Oğulcan Aral, Yusuf Cufadar 2242-2256

Antioxidative, Antimicrobial Activities and Fatty Acid Compositions of Four Agarics

Şükrü Canpolat, Elif Yürümez Canpolat, Yasemin İşlek, Ilgaz Akata, Cemil İşlek 2257-2265

In-vitro Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles Produced by Hydrothermal Method Against Some Foodborne Pathogens

Pınar Karatepe, Müzeyyen Akgöl, Sinem Bayrak, Gökhan Kürşad İncili 2266-2271

Optimization of Sesame Roasting Conditions with Air Fryer and Comparison of Its Properties with Conventional Roasting

Mustafa Şamil Argun, Abdullah Kurt 2272-2281

Effects of Ultrasound Application on the Improvement of Probiotic Properties and Antioxidant Activity of *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*

Hamza Goktas, Demet Turali, Cansu Agan, Osman Sagdic 2282-2291

Investigation of the Antioxidant Potential of Kombucha Prepared Using *Salvia officinalis* L.

Cihan Düşgün 2292-2297

Changes in Phenolic, Flavonoid and Antioxidant Capacity of Gluten-Free Crackers Enriched with Pomegranate Seeds During In Vitro Gastrointestinal Digestion

Zehra Gülsünoğlu Konuşkan, Büşra Göz 2298-2305

Enhancing Culinary Operations Through Fuzzy Logic: A Case Study in the Catering Industry

Murat Doğan 2306-2316



Assessment of Traditional and Commercial Rosehip Marmalade Samples: Physicochemical, Antioxidant, and Antibacterial Properties in Gümüşhane Province

Fırat Yılmaz

2317-2327

Investigation of the Pesticide Residues and Elemental Composition in Tomato and Cucumber samples in Tekirdağ (Türkiye) and Mamuşa (Kosova)

Serap Duraklı Velioğlu, Kadir Gürbüz Güner, Zana Sahiti Mehmeti, Özgür Sağlam, Hasan Murat Velioğlu

2328-2337

Investigation of the Physicochemical, Beneficial Microorganism, and Bioactive Properties of Colostrum Samples from Different Sheep and Goat Breeds: The Case of Burdur Province

Pelin Ertürkmen, Türker Atçalı, Esra Uğur Geçer

2338-2346

The Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Pumpkin, Rosehip and Pomegranate Seeds

Sena Bakır

2347-2354

The Functional Aspects of Spices Used in Turkish Cuisine

Özlem Özer Altundağ, Ufuk Samav

2355-2367

The Effect of Lactobacillus rhamnosus on AFM1 Detoxification in Ice Cream

Tuğba Demir, Soner Tutun

2368-2374

Review Articles

Bacteriocins as Food Bio-preservatives: Mechanism of Action, Purification and Characterization

Berna Öztürk, İlkin Şengün

2375-2397

Carbon Dots and Their Potential Usage in Food Analysis

Eren Küllük, Ali Gücükoğlu

2398-2406

Trends in Coconut Brown Sugar Production – A Review of Health and Future Prospect in the Industry

Frederick Sarpong, Domoinic Anning, Charlotte Oduro-Yeboah

2407-2414

Use of Nanoemulsion Technology in Dairy Industry

Binnur Kaptan

2415-2428

Microbial Exopolysaccharides, Their Structures, Formation Mechanisms, and Effects on Human Health: Food-Related Microorganisms

Afranur Özçoban, Ayşe İlayda Boyacı, Hale İnci Öztürk

2429-2440

Applications and Development Potential of Nano-Biotechnology in Biomedical and Health Areas

Leila Mehdizadehtapeh

2441-2450



Editorial Team

Editor in chief

Prof. Dr. Musa Sarıca, Ondokuz Mayıs University, Türkiye

Associate Editor

Prof. Dr. Hasan Eleroğlu, Sivas Cumhuriyet University, Türkiye

Prof. Dr. Ahmet Şekeroğlu, Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Sedat Karaman, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Manuscript Editor

Dr. Kadir Erensoy, Ondokuz Mayıs University, Türkiye

Editorial Board

Prof. Dr. Ebubekir Altuntaş, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Mustafa Avcı, Niğde Ömer Halisdemir University, Niğde, Türkiye

Prof. Dr. Zeki Bayramoğlu, Selçuk University, Türkiye

Prof. Dr. Kezban Candoğan, Ankara University, Türkiye

Prof. Dr. Yusuf Cufadar, Selçuk University, Türkiye

Prof. Dr. Mahmut Çetin, Çukurova University, Türkiye

Prof. Dr. Suat Dikel, Çukurova University, Türkiye

Prof. Dr. Hasan Eleroğlu, Sivas Cumhuriyet University, Türkiye

Prof. Dr. Naif Geboloğlu, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Orhan Gündüz, Malatya Turgut Özal University, Türkiye

Prof. Dr. Leyla İdikut, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Türkiye

Prof. Dr. Sedat Karaman, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Mustafa Karhan, Akdeniz University, Türkiye

Prof. Dr. Hüseyin Karlıdağ, İnönü University, Türkiye

Prof. Dr. Muharrem Kaya, Isparta Uygulamalı Bilimler University, Türkiye

Prof. Dr. Halil Kızılaslan, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Kürşat Korkmaz, Ordu University, Türkiye

Prof. Dr. Yusuf Ziya Oğrak, Sivas Cumhuriyet University, Türkiye

Prof. Dr. Bahri Devrim Özcan, Çukurova University, Türkiye

Prof. Dr. Kadir Saltalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Türkiye

Prof. Dr. Zeliha Selamoğlu, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Ahmet Şahin, Kırşehir Ahi Evran University, Türkiye

Prof. Dr. Ahmet Şekeroğlu, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Yusuf Yanar, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Arda Yıldırım, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye

Prof. Dr. Metin Yıldırım, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Zeliha Yıldırım, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Sertaç Güngör, Selçuk University, Türkiye

Prof. Dr. Hasan Tangüler, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Adnan Ünal, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Prof. Dr. Hatıra Taşkın, Çukurova University, Türkiye

Assoc. Prof. Dr. Ahmed Menevşeoğlu, Ağrı İbrahim Çeçen University, Türkiye

Assoc. Prof. Dr. Cem Baltacıoğlu, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Assoc. Prof. Dr. Hasan Gökhan Doğan, Kırşehir Ahi Evran University, Türkiye

Assoc. Prof. Dr. Ekrem Mutlu, Kastamonu University, Türkiye



Assoc. Prof. Dr. Cem Okan Özer, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Emre Şirin, Ahi Evran Üniversitesi, Türkiye
Dr. Emre Aksoy, Middle East Technical University, Türkiye
Dr. Mustafa Duman, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye
Dr. Burak Şen, Omer Halisdemir University, Türkiye

Section Editors

Prof. Dr. Alper Durak, İnönü University, Türkiye
Prof. Dr. Gülistan Erdal, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye
Prof. Dr. Zeki Gökalp, Erciyes University, Türkiye
Prof. Dr. Rüştü Hatipoğlu, Cukurova University, Türkiye
Prof. Dr. Teoman Kankılıç, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye
Prof. Dr. Osman Karkacier, Akdeniz University, Türkiye
Prof. Dr. G. Tamer Kayaalp, Cukurova University, Türkiye
Prof. Dr. Nuray Kızılaslan, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye
Prof. Dr. Hasan Rüştü Kutlu, Cukurova University, Türkiye
Prof. Dr. Hülya Eminçe Saygı, Ege University, Türkiye
Prof. Dr. İbrahim Tapkı, Mustaf Kemal University, Türkiye
Prof. Dr. Faruk Toklu, Çukurova University, Türkiye
Prof. Dr. Necati Barış Tuncel, Onsekiz Mart University, Türkiye
Prof. Dr. Erkan Yalçın, Ondokuz Mayıs University, Türkiye
Prof. Dr. Durdane Yanar, Tokat Gaziosmanpaşa University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Hüsnü Aktaş, Mardin Artuklu University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Hatun Barut, Ministry of Agriculture and Forestry, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Berken Cimen, Cukurova University, Türkiye
Prof. Dr. Nazlı Ercan, Cumhuriyet University, Türkiye
Prof. Dr. Cemal Kurt, Cukurova University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Muhammad Azhar Nadeem, Sivas University of Science and Technology, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Uğur Serbester, Çukurova University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Mustafa Sevindik, Osmaniye Korkut Ata University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Özhan Şimsek, Erciyes University, Türkiye
Assoc. Prof. Dr. Gökhan Baktemur, Sivas University of Science and Technology, Türkiye
Dr. Sara Yasemin, Siirt University, Türkiye
Dr. Brian Tanika, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Regional Editors

Prof. Dr. Mohammad Abdul Baki, Jagannath University, Bangladesh
Prof. Dr. Himayatullah Khan, Agricultural University, Pakistan
Prof. Dr. Abderrahim Benslama, University of M'sila, Algeria
Prof. Dr. Md. Parvez Anwar, Bangladesh Agricultural University, Bangladesh
Prof. Dr. Mohammad Bagher Hassanpouraghdam, University of Maragheh, Iran
Assoc. Prof. Dr. Allah Bakhsh, University of the Punjab, Pakistan
Prof. Dr. Aimee Sheree Adato Barrion, University of the Philippines, Philippines
Assoc. Prof. Dr. Claudio Ratti, University of Bologna, Italy
Assoc. Prof. Dr. Dima Alkadri, Jerash University, Jordan
Prof. Dr. Fernanda Cortez Lopes, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil
Assoc. Prof. Dr. Gheorghe Cristian Popescu, University of Pitesti, Romania
Prof. Dr. Idrees A. Nasir, University of the Punjab, Pakistan
Assoc. Prof. Dr. Jelena Zindovic, University of Montenegro, Montenegro
Assoc. Prof. Dr. Muhammad Amjad Ali, University of Agriculture, Pakistan
Assoc. Prof. Dr. Muhammad Naeem Sattar, King Faisal University Al-Ahsa, Saudi Arabia



Dr. Muhammad Rizwan Shafiq, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan
Assoc. Prof. Dr. Muhammad Qasim Shahid, South China Agricultural University, China
Assoc. Prof. Dr. Muhammad Younas Khan, University of Balochistan, Pakistan
Assoc. Prof. Dr. Neelesh Sharma, Sher-E-Kashmir University of Agricultural Sciences & Technology, India
Assoc. Prof. Dr. Noosheen Zahid, University of Poonch Rawalakot, Malezya
Assoc. Prof. Dr. Mihaela Ivancia, University of Iasi, Romania

Statistics Editor

Prof. Dr. Soner ankaya, Ondokuz Mayıs University, Türkiye
Prof. Dr. Hüdaverdi Bircan, Sivas Cumhuriyet University, Türkiye
Prof. Dr. Adnan Ünalın, Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye

Foreign Relations

Dr. Emre Aksoy, Middle East Technical University, Türkiye



Indexes

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology (TURJAF) is indexed by the following national and international scientific indexing services:

- [Directory of Open Access Journals \(DOAJ\)](#),
- [National Library of Australia \(TROVE\)](#),
- [WorldCat libraries\(WorldCat\)](#),
- [Ingenta \(Ingenta \)](#),
- [World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts \(CABI \)](#),
- [Google \(Scholar \)](#),
- [Crossref \(Journals\)](#),
- [Sobiad Citation Index](#),
- [SciMatic \(SciMatic\)](#),
- [The Food and Agriculture Organization \(AGRIS\)](#),
- [Idealonline Index](#),
- [Scilit \(SCILIT\)](#),
- [Weill Cornell Medicine - Qatar](#),
- [Indiana University Kokomo](#),
- [Academic Search Engine \(SCINAPSE\)](#),
- [Fatcat Editor \(FATCAT\)](#),
- [Academic Research Index \(ACARINDEX\)](#),
- [Information Matrix for the Analysis of Journals \(MIAR\)](#),
- [National Library of Medicine](#)
- [EBSCO host](#)
- [Originally called the European Reference Index for the Humanities or ERIH \(ERIH PLUS\)](#)
- [The Turkish Academic Network and Information Centre \(ULAKBIM\)](#),
- [ULAKBIM TR Index list of Journals \(TR-INDEX\)](#)



This work is licensed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License](#)

ISSN: 2148-127X



Turkish JAF Sci.Tech.



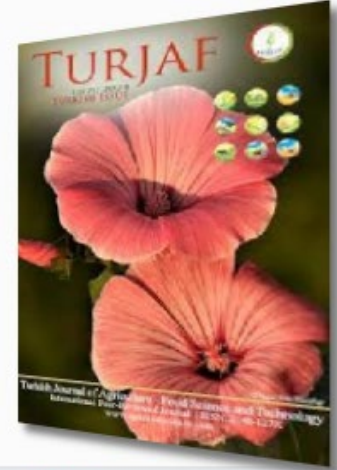
TR – DİZİN Bilgileri

Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi

Makale Sayısı	Atıf Sayısı	Kendine Atıf Sayısı
2968	2931	854
Atıf Alan Makale Sayısı	Atıf Ortalaması	Kendine Atıf Oranı
1099	0,99	%29,14

Konu Kategorisi: Fen > Ziraat Fen > Mühendislik

Konu Alanları: Ziraat Mühendisliği Gıda Bilimi ve Teknolojisi



EI 88N: 2148-127X

İlk Yayın Yılı: 2013

Diziniendiği Yıllar: 2014-2024 (Fen)

Yayın Periyodu: Ocak, Şubat, Mart, Nisan, Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım, Aralık

Yayın Formatı: Elektronik

Yayın Dili: Türkçe | İngilizce

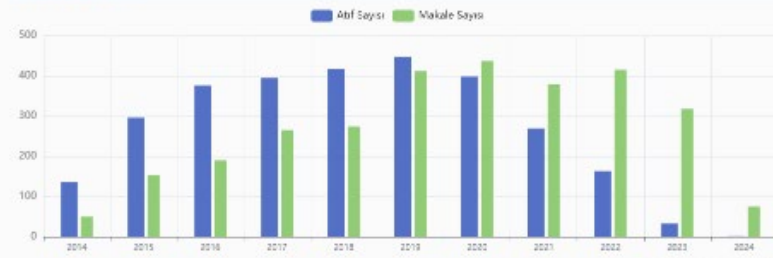
Editör: Hasan Eleroglu

Yayıncı: Turkish Science and Technology Publishing (TURSTEP)

Web Adresi: <http://www.agrifoodscience.com>



Makale & Atıf Sayısı



*Grafik Verisi ©2024 - TR Dergi

Makale Türleri

Araştırma Makalesi Deleme Diğer Olgu Sunumu Düzeltme



Potential of Nisin and Newly Discovered Bacteriocins as Preservatives for Pasteurised Milk

Getrude Okiko^{1,2,a,*}, Fredrick O. Ogutu^{2,b}

¹APC Microbiome Ireland – SFI Research Centre, University College Cork, College Road, T12K8AF, Cork, Ireland

²Food Technology Research Centre, Kenya Industrial Research and Development Institute (KIRDI) P.O. Box. 30650-00100, Nairobi, Kenya

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Research Article

Received : 14.03.2024

Accepted : 10.06.2024

Keywords:

Bacteriocins

Nisin

Pasteurization

Milk spoilage microorganisms

Indicator strains

Spoilage of pasteurized milk is mainly caused by the presence of organisms that either survive pasteurization (psychrotolerant spore-formers) or re-contaminate milk in the processing environment (post-pasteurisation contaminants). Pasteurization of bovine milk by heat treating at 72°C for 15-30 seconds ensures milk quality without impairing its organoleptic and nutritional status and extends shelf life to 12-14 days at refrigeration temperatures. Nisin A is a class I bacteriocin known to inhibit gram positive bacteria and approved by the European Food and Safety Authority as a food preservative. It is commercially available as Nisaplin®, which contains a concentration of 2.5% w/w of nisin. This study examined the effect of Nisaplin® at different concentrations on spoilage of refrigerated commercial whole pasteurized milk over a period of 59 days. At a high concentration of 4 mgml⁻¹, Nisaplin® reduced the total bacterial count below the limit of detection in the milk, and inhibition was visible for at least 14 days at 4°C. Previously isolated milk spoilage bacteria were identified using 16s rRNA gene sequencing and utilised as target indicators for bacteriocin production. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LMG6901, *Microbacterium lacticum*, and *Pseudomonas aeruginosa* were utilised as indicator strains in a screen of milk spoilage organisms for bacteriocin production. This resulted in identifying the putative bacteriocin producer *Carnobacterium divergens*, a lactic acid bacterium active against *L. bulgaricus*. The study concludes that Nisaplin® is effective in the reduction of microbial load and its effectiveness could be increased when combined with other preservative methods thus forming an extra hurdle in the milk.

^a gettieokiko@gmail.com

^{id} <https://orcid.org/0009-0005-2926-4063>

^b fogutu0@gmail.com

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-4446-9268>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Pasteurization of bovine milk extends shelf life to 12-14 days without impairing its organoleptic and nutritional qualities (El Dessouky Abdel-Aziz et al., 2020). The treatment entailing heating at 72°C for 15 seconds eliminates most susceptible bacterial species present in raw milk ensuring safety and standardizing shelf-life (Nasr & Elshaghabee, 2019). Further extension the shelf life of pasteurized milk would benefit consumers and production industries, enabling longer transport and storage times and consequently greater export potential. However, extended shelf-life milk must be minimally processed and retain a clean label (Radha et al., 2014). Shelf-life extension of commercial fluid milk beyond the simple 5 to 14 days at 4°C to 8°C of high-temperature short-time (HTST) pasteurization increases distribution distances and times, lengthens shelf life for the consumer prior to spoilage, and enhances food safety (Trmčić et al., 2015).

Milk spoilage is typically caused by either Gram-positive psychrotolerant endospore forming bacteria, usually *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. present in raw milk which can survive the pasteurization process, or post-pasteurization contaminants such as *Pseudomonas* spp. that gain access to milk due to poor post-processing conditions (Ziyaina et al., 2018) and capable of growth at refrigeration temperatures. Heat-resistant proteinases of psychrotrophic bacteria cause spoilage in processed milk because of enzyme-retaining activity after the heat treatment (Machado et al., 2017). Post pasteurization contamination (PPC) often results in spoilage within 7 to 14 days and represents psychrotolerant Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas* spp, coliforms such as *Escherchia coli*, and other members of the *Enterobacteriaceae* family (Martin et al., 2018). Spoilage due to the outgrowth of aerobic, Gram-positive, spore

forming bacteria such as *Paenibacillus* spp. and *Bacillus* spp. typically occurs around 17 to 21 days of shelf-life if milk is stored around 6°C (Doll et al., 2017). The onset can be rapid, within (7) days, suggesting contamination with viable bacterial cells, which are not delayed by the germination process of spores (Ranieri et al., 2012). Non-endospore forming bacteria such as *Enterococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. have also been found to tolerate temperatures of 60–80°C surviving in large numbers. Those surviving pasteurization, though their growth is severely reduced by storage at refrigeration temperatures take a few weeks to spoil milk (Rawat, 2015).

There are several methods currently used to extend the shelf-life of milk including ultra-pasteurization (UP), ultra-high temperature (UHT) pasteurization and microfiltration (MF). Extended shelf-life (ESL) milk has gained a substantial market share in many countries and is produced by thermal processing using conditions between those used for traditional HTST pasteurization and those used for UHT sterilization (Deeth, 2017) (Schmidt et al., 2012). The most fundamental rationale for producing ESL milk is to inactivate all vegetative bacteria and spores of psychrotrophic bacteria and to cause a minimal chemical change that can result in cooked flavour development (Castillejo et al., 2016). The primary focus of UHT is to eradicate *Bacillus cereus*, as many strains of this organism are pathogenic and can grow at temperatures below 7°C. Spores of certain *B. cereus* strains are extremely heat-resistant and cause spoilage of milk (Pujol et al., 2015). The ESL is produced using high temperatures which could affect the milk organoleptic qualities (Deeth, 2017). The ESL or ultra-pasteurized milk is produced by thermal processing using conditions between those used for traditional HTST pasteurization and those used for UHT sterilization. It should have a refrigerated shelf-life of more than 30 days.

Bacteriocins are small (<10 kDa), ribosomal produced antimicrobial peptides produced by bacteria that are typically heat stable. Nisin A is the prototypical bacteriocin which has been studied extensively since its discovery. It is a 34 amino acid heat stable bacteriocin peptide produced by strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and over 10 natural variants from multiple species of nisin: A, Z, F, Q, U, U2, O, P, J and H (Cotter et al., 2013). Nisin is one of two bacteriocins currently registered for use as a food additive to extending its shelf-life by inhibiting spoilage and pathogenic microorganisms (Ibarra-Sánchez et al., 2020). Nisin is classified as generally recognized as safe (GRAS) by the U.S Food and Drug Administration (FDA) and employed as a food bio-preservative approved by the European Food Safety Authority (EFSA) under the E number E234. It is non-toxic, flavourless, odourless, and is employed as a partially purified powder under the product name Nisaplin® (Danisco). Once ingested, nisin is inactivated by trypsin and pancreatin, therefore it has no effect on the gut microbiome. Moreover, the fact that humans have probably been exposed to it for centuries and having a daily acceptable intake (DSI) of 0.13 mg of nisin /kg of bodyweight deems it safe as a bio preservative (Soltani et al., 2021).

Nisaplin® has been shown to be effective in the microbial control of several dairy products and its use has been widely assessed in cheese manufacturing (Martinez et al., 2016). It is made through the fermentation of skimmed

milk that has been digested by enzymes. The yeast is then added by *L. lactis* sbsp. *lactis* strains that also produce nisin. (Shimizu et al., 1999) This process is maintained at a pH of 6-7 and once done, the product is concentrated by foam extraction or membrane filtration. It is then precipitated and subjected to spray drying after which sodium chloride is added to the powder to standardize it to 1,000 international units (IU) nisin A/mg. (25% nisin A wt/wt) (Younes et al., 2017). In cheese making, nisin-producing and nisin-resistant starter cultures are both incorporated to maintain the process while at the same time controlling food-borne pathogens and spoilage bacteria (Radha et al., 2014) (Melini et al., 2017). It was reported that the concoction of nisin with other antimicrobial compounds, such as the monoester of lauric acid, monolaurin, and the milk lactoperoxidase system (LPS) or other bacteriocins can induce the sensitization of resistant spoilage and food-borne microorganisms (Zhang et al., 2014). Monolaurin and nisin combined have proved to successfully exert a bactericidal effect against different *Bacillus* species in skim milk, and inhibited their regrowth and sporulation (Rawat, 2015).

There are limitations that curb the use of Nisaplin® in dairy products, such as adsorption of the peptide to fat and the surface of protein globules (Silva et al., 2018). Studies have reported an interaction between milk fat and nisin activity, which may limit its application in fat containing dairy products. The peptide is positively charged and targets bacterial membranes where it may form pores, but it can be sequestered by milk fat globule membranes (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). The activity of nisin against *Listeria monocytogenes* in milk was found to decrease as the milk fat concentration and increased with a maximum anti-listerial effect of nisin in skim milk and a reduced effect in milk with 17.5% fat (Chen & Zhong, 2017). It has also been noted that homogenization of milk reduces the anti-listerial activity of nisin (Wang et al., 2023).

Nisin has been approved for use in over 50 countries and was granted generally recognized as safe (GRAS) status by the FDA in 1988 (Saad et al., 2019). The World Health Organization Codex Committee on milk and milk products allows pure nisin as a food additive for processed cheese at a concentration of 12.5 mg/kg product, whereas up to 250 mg/kg is permitted by the US FDA (Zhang et al., 2014). Nisin, either added directly in purified form or produced, is used in several dairy food applications to ensure safety, extend shelf-life, and preserve quality (Chen & Zhong, 2017).

Consumers are increasingly becoming health conscious and averse to preservatives perceived as 'chemical' or 'unnatural' in foods. Nisin in contrast is a safe naturally expressed peptide partially purified in the form of Nisaplin®. Utilization of bacteriocins such as nisin as a bio-preservative alone or in combination with other treatments represents a method to extend milk shelf life and ensure its sensory properties are not altered (Radha et al., 2014). In this study Nisaplin® at a range of concentrations was assessed as a preservative for pasteurized commercial whole milk over a period of 59 days. Total aerobic plate counts were determined and 16s rRNA gene sequencing was utilised to determine the effect on the pasteurised milk spoilage bacteria microbiota. In addition, milk spoilage organisms were assayed for bacteriocin production against

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* LMG6901, *Microbacterium lacticum* and *Pseudomonas aeruginosa* to identify novel bacteriocins and bacteriocin producers with activity against milk spoilage organisms.

Materials and Methods

Effect of Nisaplin® on commercial pasteurised milk

Unless otherwise stated, all the experiments were performed in biological and technical triplicate at laboratory scale in 250 ml Durham bottles, as illustrated in figure 1. Experiments were performed through different time frames spread over 59-day intervals. One Litre of commercial milk (Dawn, Ballinahina) was purchased on successive weeks for each biological replicate. The milk was then divided into four and aliquoted into sterile vessels. Nisaplin® (2.5% nisin from *L. lactis* subsp. *lactis* balanced with sodium chloride and denatured milk solids, Sigma-Aldrich, Wicklow, Ireland) was added to the pasteurised whole milk in different concentrations; 0 mg ml⁻¹, 0.04 mg ml⁻¹, 0.4 mg ml⁻¹ and 4 mg ml⁻¹. This was first done by making a small solution of the Nisaplin® with a portion of the milk in a 50 ml sterling tube, vortexing it and then adding it to the milk sample and gently rolling it to ensure even distribution while avoiding bubbles. The solutions were then vortexed until homogenous, aliquoted into three volumes for technical replicates and stored at 4°C for 59 days. Serial dilutions and plating were subsequently done at day 0, 1, 3, 7, 14, 28, 49 and 59. 100 µl of the milk sample was aseptically removed and spread plated on plate count skim milk agar (MPCA) made in the lab (comprising of peptone from casein 5 g/L Yeast extract 2.5 g/L Skim milk powder 1 g/L Glucose 1 g/L and Agar 15 g/L), following serial dilution in maximum recovery diluent (MRD; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom). The plates were then incubated at 30°C for 72 h and then plate counts were carried out after each time points.

Milk spoilage microorganisms (culture strains and conditions)

Bacterial isolates from a previous study (Hill et al., 2018) were retrieved from -80°C glycerol stocks and streaked on brain heart infusion (BHI) (Oxoid) and skimmed milk plate count agar (MPCA) and incubated for 72 h at 30°C. Pure streaks were subject to Gram stain and colony PCR for identification. For colony PCR a single colony was touched with a 200 µl pipette tip and swirled in 50 µl molecular grade H₂O. The solution was then subject to freeze thaw and utilised as template for the reaction. PCR amplification was performed using B27F and U1492R universal primers and the PCR product purified (GenElute, Sigma-Aldrich). The DNA was quantified using a Qubit 4.0 fluorometer and samples were sent to Genewiz, Germany, for Sanger sequencing of amplified 16s rRNA gene to identify the milk spoilage microorganisms.

Potential Bacteriocin Production

Initial screening of antimicrobial activity

Following quantification of TBC from Nisaplin containing milk, over 6000 colonies were screened against milk spoilage organisms *M. lacticum*, and *P. aeruginosa* in addition to an acid resistant indicator, *L. bulgaricus*

LMG6901, for potential bacteriocins using the agar based deferred antagonism assay as described by Twomey et al., 2021 illustrated in Figure 2, with minor adjustments.

These bacteria were selected as potential indicator microorganisms due to their abundance in the composition of the spoilage microorganisms. The different indicator strains and were grown overnight in MPCA, BHI and MRS broths and incubated overnight at 30°C and 37°C respectively depending on their optimal conditions. They were then seeded (0.25% vol/vol) into the subsequent 7.5 g/L sloppy agar that had been tempered to 50°C and poured onto the milk spoilage microorganism plates, allowed to dry, and incubated overnight based on their optimal conditions. They were then examined for the presence of zones of clearing in the overlay indicative of antimicrobial activity.

Isolates which resulted in distinct zones of inhibition were further cultured in broth for well diffusion assays. 20 ml each of tempered sloppy agar seeded with the indicator strains above were poured and allowed to set into which 6mm-wide wells were punctured into it using a glass Pasteur pipette. Grown cultures were centrifuged at maximum speed (16,000 x g) for 4 min to pellet cells. The resulting supernatant was filter sterilised and 50 µl was added to bored wells. Plates incubated overnight according to the respective optimal conditions of the indicator strains. They were then examined for zones of inhibition the next day (Sugrue et al., 2020). Strains found to produce active supernatant were repeated with cell free supernatant brought to neutral pH through addition of 1M NaOH.

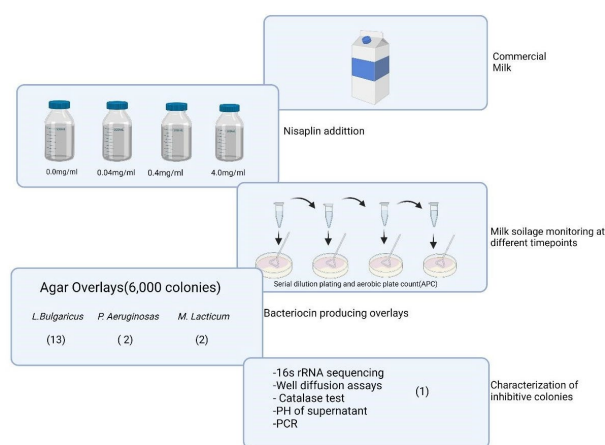


Figure 1. Experimental Overview

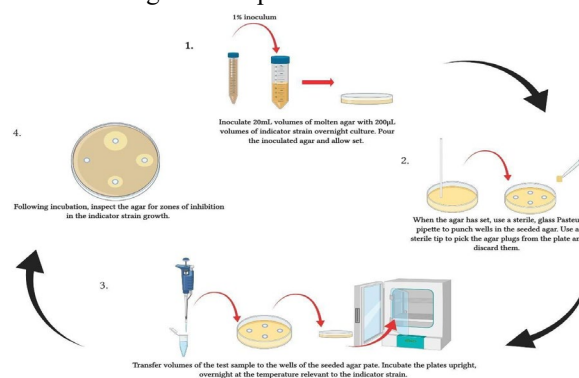


Figure 2. Agar-based well diffusion assay to detect antimicrobial activity.

The Zones of inhibition in the growth of the indicator strain indicate antimicrobial activity. Source (Twomey et al., 2021).

Strain identification and genome sequencing

To identify the potential bacteriocin producing microorganism, DNA was extracted following the protocol from the GenElute bacterial genomic DNA kit (Sigma). PCR amplification was then done following the Meridian Bioscience™ protocol with B27F and U1492R as the universal amplification primers. Quantification was also done using the Qubit 4.0 broad range kit and then sent for 16s rRNA gene was subject to sanger sequencing (Genewiz, Germany).

Data Analysis

The data on microbial levels of milk treated with varying concentration of Nisaplin® was analyzed as Mean±SD of triplicate treatments. The mean value ± standard deviation (SD) was used in data analysis. The Analysis of variance, means, standard deviation and Bonferroni test was used to test for significance using GraphPad prism version 8 (GraphPad Software, Inc. CA, USA). Means of different treatments were significantly different at p-value (P< 0.05).

Results

Effect of Nisaplin® on Commercial Pasteurised Milk

The effect of Nisaplin® on commercial pasteurised milk is presented in figure 3. Three different biological replicates were tested against different Nisaplin® concentrations in triplicates. The limit of detection for the total bacterial count (TBC) (\log_{10} CFU ml^{-1}) of the milk samples was 2.48 log CFU ml^{-1} and pre-addition of Nisaplin® (0 mg ml^{-1} , Day 0) the mean TBC at baseline was 2.96 \log_{10} CFU ml^{-1} . Nisaplin® impacted at all concentrations but by day 14 the spoilage organisms rebound in the 0.04 and 0.4 mg ml^{-1} groups. However, it is observed that Nisaplin® effectively controlled milk spoilage up to 14 days at a high concentration of 4 mg ml^{-1} , at refrigeration temperatures of 4°C at the concentration of 4.0 mg ml^{-1} in two replicates out of three replicates.

The limit of detection for the total bacterial count (TBC) (Log CFU ml^{-1}) of the milk samples was 2.48 log CFU ml^{-1} . Pre-addition of Nisaplin® the milk samples had a baseline average TBC of 2.96 log CFU ml^{-1} with replicate 3 being below detection level. At day 0, replicate 1 had a TBC of 2.67 log CFU ml^{-1} pre-addition but soon after addition at 0.04 mg ml^{-1} the TBC was below detection levels. It was observed that the Nisaplin® impacts at all concentrations but is most significant at 4 mg ml^{-1} concentration, where up to day 14 the TBC is below detection as shown in figure 3.

It was also noted that in the sample without Nisaplin®, the TBC increased steadily throughout the timeframe from an average of 2.96 log CFU ml^{-1} at day 0 to 8.66 log CFU ml^{-1} at day 56 at refrigeration temperatures. The count at 4mg ml^{-1} remained below detection levels until day 14 and then had a sudden surge of growth with high bacterial counts of 9.69 log CFU ml^{-1} and 9.86 log CFU ml^{-1} between day 28 and 56, respectively.

The higher the Nisaplin® concentration the longer the bacterial inhibition. The blank sample did not exhibit much inhibition and acted as the control in the experiment. There was spoilage organism rebound in the 0.04 and 0.4 mg ml^{-1} groups. However, it is observed that Nisaplin® effectively controlled milk spoilage up to 14 days at a high concentration of 4mg ml^{-1} , at refrigeration temperatures of

4°C at the concentration of 4.0 mg ml^{-1} in two replicates out of three replicates. The strongest effect was recorded between day 0 and day 14 where the TBC was below the limit of detection, 2.48 log CFU ml^{-1} .

Milk spoilage microorganism identification from stock

Thirty-three isolates from a previous shelf-life study of milk at refrigeration and room temperature were identified for use as indicators in the bacteriocin screen. Thirty-two of the isolates were gram positive, as presented in Table 1. The isolates were identified as *Microbacterium lacticum* (87.5%), *Kocuria varians* (3.12%), *Microbacterium flavum* (3.12%) and *Brachybacterium nesterenkovii* (6.25%). *M. lacticum* were found from milk spoiled at 20°C (23 isolates) and 4°C (4 isolates).

Isolating Bacteriocin producers from the milk spoilage microbiome

An estimated 6000 bacterial colonies from the pasteurized commercial milk samples were screened for bacteriocin production. Out of this number, seventeen exhibited a zone of inhibition in agar overlay against at least one indicator. Thirteen isolates produced zones against *L. bulgaricus* LMG6901, two against *M. lacticum* and two produced zones against *P. aeruginosa*. The zones of inhibition are illustrated in table 2. Through 16s rRNA gene sequencing, the antimicrobial producing spoilage microorganisms identified included *P. aeruginosa*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *C. divergens*, *Paenibacillus rhizoplanae* and *Pseudomonas gessardii* as summarized in Table 3. *P. aeruginosa*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus rhizoplanae* and *Pseudomonas gessardii* all produced zones in the sloppy gar overlays but did not show any activity in the well assays with the cell free supernatant.

A single isolate had exhibited a 4mm zone in agar overlay against *L. bulgaricus* LMG6901 which was also produced activity into supernatant measured by well diffusion assay. Activity was confirmed with neutralised CFS in well diffusion assay eliminating the potential inhibitive effect of acidic pH. 16S rRNA gene sequencing was used to identify the bacteria as *C. divergens* with 98% percentage identity.

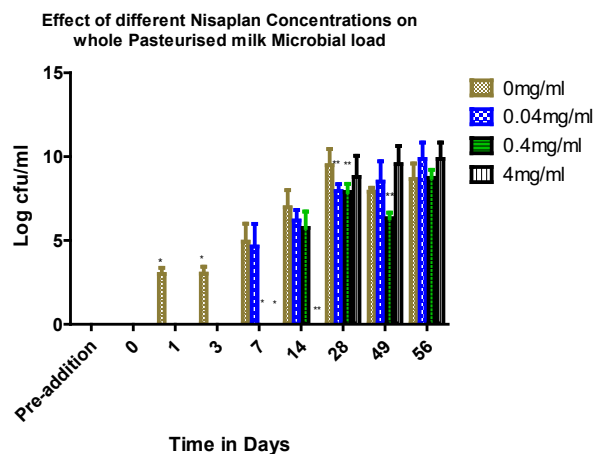


Figure 3. Graph illustrating the effects of Nisaplin® on commercial whole pasteurised milk across different time frames (days). PZF format from GraphPad Prism.

Table 1. Milk spoilage bacterial indicator species identification by 16S rRNA sequencing

16s Identification Species	Percent	Source	Gram stain Identity
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.9	4°C	positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	97.67	4°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	98.3	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	98.3	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.06	20°C	negative cocci, with gram variables
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.4	20°C	positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.61	20°C	positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.55	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.99	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.54	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.54	20°C	positive rods
<i>Staphylococcus succinus</i>	100	20°C	positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	Positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.89	20°C	positive cocci
<i>Kocuria varians</i>	100	20°C	positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	97.95	4°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	97.95	4°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.5	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.72	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.58	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	Positive rods
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	99.81	4°C	Positive rods
<i>Microbacterium flavum</i>	100	20°C	Positive rods
<i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	99.46	20°C	Positive cocci
<i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	99.46	20°C	Positive cocci
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	Positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.73	20°C	Positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.58	20°C	Positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	99.72	20°C	Positive rods
<i>Microbacterium lacticum</i>	100	20°C	Positive rods

Table 2. Bacteriocin screening and well diffusion assays

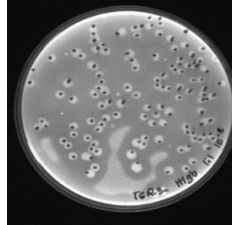


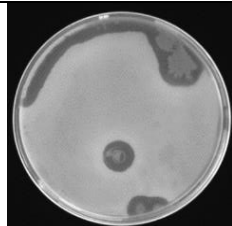

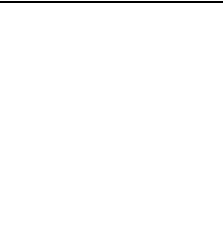
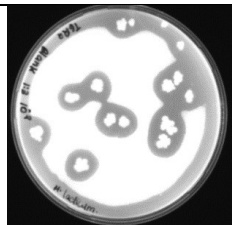

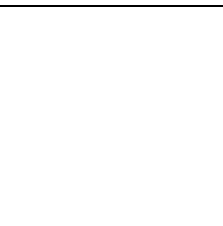
Overlays	Well diffusions with CFS	Well diffusions with neutral CFS
<i>1. Lactobacillus bulgaricus</i>		
		
<i>2. Pseudomonas aeruginosas</i>		
		
<i>3. Microbacterium lacticum</i>		
		

Table 3. Putative bacteriocin producers identified by 16S rRNA gene sequencing and indicator strains inhibited.

Milk spoilage microorganism (16S.rRNA)	Gram stain	Growth conditions	Percentage ID	Indicator strains
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	99.55	<i>Microbacterium lacticum</i>
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	positive rods	aerobic	99.42	<i>Microbacterium lacticum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	99.82	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	positive rods	aerobic	100	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	positive rods	aerobic	99.9	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	positive rods	aerobic	99.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	100	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	99.68	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	99.34	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Carnobacterium divergens</i>	positive rods	facultative anaerobe	98.77	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	positive rods	aerobic	98.27	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	98.08	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	95.64	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Paenibacillus rhizoplanae</i>	positive rods	aerobic	97.82	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	positive rods	aerobic	99.46	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas gessardii</i>	negative rods	aerobic	99.52	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative rods	aerobic	99.91	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>

Discussion

Effect of Nisaplin® on Commercialized Whole Milk

According to (Meliani & Bensoltane, 2015), milk is generally regarded as spoiled when the bacterial count exceeds 10^6 cfu. Since the microorganisms produce enzymes that degrade milk, off odors and curdling were also considered as signs of spoilage. The fact that after day 14, no significant difference was recorded in the total bacteria count with a high concentration of 4 mgml^{-1} can be explained by variability in the initial total bacteria count of the milk replicates and different batches. This was mainly dependent on the batch numbers and various days of purchase of the pasteurized milk, although the samples were sourced from the same location and the brand was consistent. It could also be possible that the third replicate may particularly be spoiled by Gram negative bacteria which are inherently resistant to nisin. The early spoilage in sample milk with no nisin concentration could be attributed to the highly developed acidity caused by the multiplication of lactic acid bacteria. It could also be that the milk spoiled as it normally does in its pasteurised shelf life. In the milks containing Nisaplin®, this process may have been inhibited and thereby delayed the development of acidity thus prolonging the shelf life of the milk sample.

Initial microbial load of the milk post pasteurisation is a key contributor towards milk spoilage. This is evident given by the third replicate and how its initial count was slightly higher than the other two. Nisin is not effective against Gram-negative bacteria, and this could be another explanation for the variations between the replicates. It is possible that the milk microbiome could have been altered from Gram-positive dominant bacteria to gram negatives like *Pseudomonas* spp thus accelerating the milk spoilage. A combination of treatments like high pressure treatment (HPT) to effectively eliminate the Gram-negatives could be implemented in this case (Arqués et al., 2008). It was observed an extension in the shelf life of nisin added pasteurized milk from 72 h to 132 h under tropical conditions. The difference in total bacterial count between the concentrations shows Nisaplin® effect in a short time - a matter of minutes. This means that its action is almost immediate. A study by (Wirjantoro et al., 2001) reported seven days extension in shelf life of pasteurized milk added with the very low level of Nisaplin® (10 IUml^{-1}).

Nonetheless, it was observed that total bacteria count with high concentration of 4 mgml^{-1} increased significantly, particularly from day 28 to 56. This signified possible resistant cells given that some bacteria can survive extreme conditions and become resistant to some harsh conditions. It is vital to know the composition of the food product and its processing conditions to ascertain proper preservation methods and dosage. The fact that the efficiency of Nisaplin® was observed to be reducing over time has been credited to the interaction of fat globules and the peptide.

It is also fundamental to note that the refrigeration temperature of 4°C , where the milk was stored, was a hurdle to microbial growth and could also be a factor hindering growth of the microorganisms. Its combination with Nisaplin® could have been an additional factor in optimizing the antimicrobial effect on the milk. The composition of Nisaplin® is such that it contains denatured milk solids and sodium chloride at 50% wt/wt to 75% wt/wt. (Younes et al., 2017). Moreover, there is 1000 IU nisin A/mg of Nisaplin® in the milk sample, which translates to $0.025 \mu\text{g}$ of pure nisin (Younes et al., 2017). This means that 40 mgL^{-1} of Nisaplin® would add 20-35 mg of sodium chloride to the milk sample. This would therefore complement the already existing hurdles and the inhibitory effect in general.

Despite the modern-day consumer being conscious of food additives and that Nisaplin® is generally viewed as a clean label, high quantities may negatively impact the consumer and the organoleptic properties of the milk may also end up being altered. The Nisin concentration to pasteurized milk according to (Wirjantoro et al., 2001), maintains the quality of the milk product and consumers are satisfied with it as a clean preservative. Moreover, (Susanto, 2017) argued that Nisaplin® is preferred as a clean preservative and does not change the nature and taste of the food in most cases.

According to the Central Statistics Office (CSO) statistical released on 31st of August 2021, 1,018 million litres of milk was sold in Ireland in the month of July alone, as pasteurized whole milk direct for human consumption, representing an increase of 3.3% from July of 2020 (<https://www.cso.ie/en/releasesandpublications/er/ms/milkstatisticsjuly2021/>). Kenya reported approximately 5.2

billion litres of milk production in the year 2015. Of these, only 616 million litres of milk were processed, with the bulk of it, 70% sold as is un-chilled raw fresh milk through informal market outlets (<https://www.3r-kenya.org/dairy/>). The cost of production per litre was at approximately 26.8 cents in Ireland in 2018 according to (Teagasc, 2020) in comparison to Ksh.23 (€0.18) in Kenya currently (<https://www.the-star.co.ke/news/2021-06-13-cost-of-milk-production-still-high-at-sh23-a-litre-says-munya/>). The Kenyan market for UHT and powdered milk is considered higher than fresh pasteurized whole milk due to less developed storage systems that usually see constant power outage situations. This translates to inconsistencies in storage temperatures especially in the rural parts of the countries where access to these amenities is a luxury. A study done by (Njarui et al., 2011) revealed that 99% and 84% of rural and urban households prefer raw respectively. It also reported that the more processing milk undergoes the less likely it is to be consumed by the average market because it was more affordable and widely available. Given that 1 kg of Nisaplin® would cost anywhere from \$26 to \$75 USD (€22.05 to €63.62) (https://www.alibaba.com/product-detail/Nisin-Nisinnisin-Best-Price-Food-Grade_1600288836248.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.33904e4dExL5Jg_&s=p) it would therefore mean that incorporating it at 4 mgml⁻¹ in the production process would minimally increase the cost of the milk. This marginal increase may be tolerated by the consumer if offset by shelf-life extension and no detectable differences in sensory properties were found.

Milk Spoilage Microorganism Identification from Stock

Cooling milk controls microorganism multiplication especially mesophilic bacteria that acidify milk causing the proteins to be unstable. Some of these though, are psychrotrophs that survive refrigeration temperatures by synthesizing phospholipids, permitting them to adapt and function at these conditions and excrete extracellular enzymes (McAuley et al., 2016). This then causes the carbohydrates present in milk to ferment, mainly the lactose to lactic acid and other products. The enzymatic reaction over time, is responsible for rancidity and makes fermented dairy product get the thick consistency as compared to fresh milk (Baglinière et al., 2017).

Pseudomonas spp. is a major known spoilage psychrotroph and its absence in this study could be explained by good hygienic conditions that minimize contamination levels in the processing plant where the samples were sourced. Due to the advances in the mechanization process of dairy, PPC spoilage has greatly reduced, and milk spoilage is now mainly because of aerobic, gram-positive spore formers, especially psychrotolerant *Bacilli sp.* (Ribeiro Júnior et al., 2018). If milk is refrigerated though at 4°C, spoilage due to these microorganisms would essentially take longer to be visible; between 17-21 days. In cases where both spore forming and non-spore forming gram positive bacteria are responsible for spoilage, then the process takes a shorter time since the cells are not delayed by the spore germination process (Trmčić et al., 2015).

Most of the bacteria here were gram positive with *M. lacticum* being the most dominant species. It is common

bacteria found on/in milk equipment, and this may be considered the reason why it appeared in large numbers in the milk samples (Speck, 1943). These cells required 72 h on skimmed milk plate count agar (SMPCA) at 30°C to fully grow on a plate and develop colonies and were properly visible in 24 hours. This could be a reason as to why it is usually missed in routine checks as plates are typically incubated at 37°C for 24 h (Speck, 1943). The spoilage microorganisms seem to thrive in the pasteurized milk due to the bacteria that contaminate the milk after the pasteurization process. The spoilage microorganisms drive the deterioration of milk in colour, odour, or flavour to the point where it is unsuitable for human consumption.

This microorganism does not form spores, is non-motile and appears as smooth, small, round, off white colonies on SMPCA. They are characterized to be aerobes and are also weak acid producers. They have been demonstrated to produce sufficient lactic acid in 7 days at 30°C to curdle milk (Trmčić et al., 2015). An exceptional characteristic, however, is that *M. lacticum* is heat resistant and has been reported to survive up to 76°C for up to 30 min, indicating that it may survive HTST pasteurization. A previous study by (Trmčić et al., 2015) also reports that some isolates withstood up to 85°C for 10 min and would only be eliminated at 30 min. It is interesting though that no growth was recorded at these conditions. Further, *M. lacticum* is not considered pathogenic and its presence in the milk sample should not raise alarm. The microorganism has its origins in the intestines and faecal material of animals therefore mainly accessing the milk through the farm milking equipment (Speck, 1943). Their high tolerance to heat also helps them to survive the high temperatures of the water used in cleaning and once present in the milk they then carry on even through the pasteurization process as well.

The microbial content of milk can be used to estimate its quality and the conditions of production. In some cases, bacteria in milk can cause spoilage when permitted to multiply since milk is potentially susceptible to contamination with pathogenic microorganisms (Martin et al., 2018). Precautions must be taken to minimize this possibility and to destroy pathogens that may gain entrance. Certain microorganisms produce chemical changes that are desirable in the production of dairy products such as cheese, yogurt, and the addition of nisin is known to prevent the multiplication of lactic acid bacteria and thereby delay the development of acidity and prolonged the shelf life (Melini et al., 2017).

The proper pasteurization process can be conducted to eliminate spoilage microorganisms. Pasteurization of milk requires temperatures of 63°C maintained for 30 min or heating to a higher temperature, 72°C and holding for 15s before repackaging (Deeth, 2017). Pasteurization aims to making milk and milk products safe for human consumption by destroying all pathogenic bacteria. There are different ways to pasteurize milk and each process depends on the length of time and the temperature milk is heated. The pasteurized product group includes whole milk, skim milk, standardized milk, and various types of cream (Eisner, 2021). It is meant to wipe out pathogenic microbes in milk with minimal effect to its taste or nutritional value.

Isolating Bacteriocin Producers from the Milk Spoilage Microbiome

The indicator species used for bacteriocin screening *M. lacticum*, *P. aeruginosas* and *L. bulgaricus*. These microorganisms form a considerable part of the thermophilic bacterial flora of raw and pasteurized milk, powdered milk, cheese, and dairy equipment. Report by (Thorat, 2013) noted that *Lactobacilli* have been used in many fermentation processes and is characterized as gram positive, catalase negative, non-sporulating, non-pigmented bacteria. A study conducted by (Saad et al., 2019) also indicates that the most common milk spoilage microorganisms include *P. aeruginosas*, *C. divergens* and *P. polymyxa*. In addition, (Silva et al., 2018) notes that *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas aeruginosas* and *Bacillus licheniformis* are the main milk spoilage microorganisms active in the pasteurized milk.

The zones produced are indicators of antimicrobial activity, they cannot be used to determine potency, where the size of the peptide and the media components may have an effect (Daba & Elkhateeb, 2020). The zone produced by *C. divergens* against *L. bulgaricus* LMG6901 had a 4mm radius. Well diffusion assays determine the bacteriocin activity; whether it remains bound to the cell or is available in the surrounding media (Twomey et al., 2021). Low pH facilitates the release of bacteriocins into the surrounding media and therefore this is a method of purifying various peptides. The fact that *C. divergens* demonstrated a zone even after neutralizing the pH indicated that the activity is not due to acidic pH which can also produce zones of inhibition. Future work may confirm the proteinaceous nature of the activity by heat and protease treatment of the supernatant.

C. divergens is a lactic acid bacterium that was in 2002 included in the authoritative list issued after a joint venture between the International Dairy Federation and the European Food and Feed Cultures Association (Bourdichon et al., 2012) as a food bio preservative. The *C. divergens* V41, has also been shown to inhibit *Listeria monocytogenes* for up to 4 weeks of vacuum storage at 4°C and 8°C (< 50 CFU/g) (Brillet et al., 2004) This has been credited to the class IIa bacteriocin, divercin V41 (Métivier et al., 1998) whose safety and acceptability standards were presented by (Brillet et al., 2005). (Brillet et al., 2005) did not record any spoiling capacity for *Carnobacterium sp.* and the microorganism was not shown to produce any off odour in cold smoked meat in the 14-day period. The tasting panel however recorded a slight off taste at very low levels in the samples with high *C. divergens* V41 although the samples did not contain significant bacterial counts. The sensory parameters are regarded as so low that it would probably be undetected by an untrained consumer palate (Brillet et al., 2005).

It could be possible that the other strains that did not produce zones did not have potential bacteriocins or that the potential indicators used were just not the right ones. A suitable strain may not reach the required density if the media and required conditions are not conducive. This could mean that bacteriocin is being produced in very minimal quantities resulting in failure in observing the activity. It is imperative to ensure that the growth conditions are optimal. Choice of indicator strain is also

very critical in terms of significance. Moreover, given that different strains even within the same species can vary in terms of antimicrobial sensitivity, initial screening of multiple strains should be done to ascertain the best results and reduce chances of an antimicrobial being overlooked. The indicator strain should also have a high degree of sensitivity to detect activity in low concentrations (Twomey et al., 2021). These could be the possible reasons for lack of activity on many of the screened cultures and explain why out of a large starting bank of 1000 isolates, only 1% showed activity. The fact that a particular bacterium is from a different niche could also cause its potential antimicrobial activity to be missed (Pircalabioru et al., 2021).

Declarations

Acknowledgements

This work was supported by Irish Aid Fellowship Programme. The authors would like to acknowledge the Kenya Industrial Research and Development Institute (KIRDI), University College Cork and APC Microbiome, Ireland for their support in this study. Special thanks to Benson Githieya Gakuo, Bantu Gakuo Githieya and Remi Wangeci Githieya for their constant support throughout the entirety of this project.

Conflict of Interest

The authors declare existence of no conflict of interest whatsoever.

References

- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., & Medina, M. (2008). Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227(1), 77–82. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0695-8>
- Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., de Carvalho, A. F., & Vanetti, M. C. D. (2017). Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. *International Dairy Journal*, 68, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.012>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Bouttefroy, A., & Leroi, F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1029–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02383.x>
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.012>

- Castillejo, N., Martínez-Hernández, G. B., Gómez, P. A., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2016). Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2143-2>
- Chen, H., & Zhong, Q. (2017). Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 260(April), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.013>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28(July), 101750. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101750>
- Deeth, H. (2017). Optimum thermal processing for extended shelf-life (Esl) milk. *Foods*, 6(11). <https://doi.org/10.3390/foods6110102>
- Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2017). Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00135>
- Eisner, M. D. (2021). Direct and indirect heating of milk – A technological perspective beyond time-temperature profiles. *International Dairy Journal*, 122, 105145. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105145>
- El Dessouky Abdel-Aziz, M., Darwish, M. S., Mohamed, A. H., El-Khateeb, A. Y., & Hamed, S. E. (2020). Potential activity of aqueous fig leaves extract, olive leaves extract and their mixture as natural preservatives to extend the shelf life of pasteurized buffalo milk. *Foods*, 9(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods9050615>
- Gradisteanu Pircalabioru, G., Popa, L. I., Marutescu, L., Gheorghie, I., Popa, M., Czobor Barbu, I., Cristescu, R., & Chifiriu, M. C. (2021). Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 2, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020196>
- Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162–7168. <https://doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- <https://www.cso.ie/en/releasesandpublications/er/ms/milkstatistcsjuly2021/06thSeptember2021>
- <https://www.3r-kenya.org/dairy/02ndSeptember2021>
- <https://www.the-star.co.ke/news/2021-06-13-cost-of-milk-production-still-high-at-sh23-alitre-says-munya/13thSeptember2021>
- [https://www.alibaba.com/product-detail/Nisin-Nisinnisin-Best-Price-Food-Grade_1600288836248.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.33904e4dExL5Jg&s=p\)13thSeptember2021](https://www.alibaba.com/product-detail/Nisin-Nisinnisin-Best-Price-Food-Grade_1600288836248.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.33904e4dExL5Jg&s=p)13thSeptember2021)
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., & Karam, L. (2020). Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2041–2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Coillie, E. Van, Vanetti, M. C. D., Block, J. De, & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>
- Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 861–870. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13339>
- Martinez, R. C. R., Alvarenga, V. O., Thomazini, M., Fávoro-Trindade, C. S., & Sant'Ana, A. de S. (2016). Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- McAuley, C. M., Singh, T. K., Haro-Maza, J. F., Williams, R., & Buckow, R. (2016). Microbiological and physicochemical stability of raw, pasteurised or pulsed electric field-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.030>
- Meliani, A., & Bensoltane, A. (2015). Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 03(01). <https://doi.org/10.4172/2375-446x.1000126>
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., & Ruzzi, M. (2017). Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health Risks to Nutritional Quality. *Beverages*, 3(4), 54. <https://doi.org/10.3390/beverages3040054>
- Métivier, A., Pilet, M. F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J. C., Marion, D., Cenatiempo, Y., & Fremaux, C. (1998). Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: Primary structure and genomic organization. *Microbiology*, 144(10), 2837–2844. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-10-2837>
- Nasr, N. F., & Elshaghabe, F. M. F. (2019). Enhancement of Shelf Life of Pasteurized Milk Using Nisaplin® Essential Oils Emulsion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(09), 257–266. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.031>
- P.R.Thorat, P. V. D. (2013). Bacteriocin review. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 2(1).
- Pujol, L., Johnson, N. B., Magras, C., Albert, I., & Membré, J. M. (2015). Added value of experts' knowledge to improve a quantitative microbial exposure assessment model - Application to aseptic-UHT food products. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.015>
- Radha, K., Sciences, A., & Veterinary, K. (2014). Nisin as a biopreservative for pasteurized milk. *Indian Journal of Veterinary and Animal Sciences Research*, 43(December), 436–444.
- Ranieri, M. L., Ivy, R. A., Robert Mitchell, W., Call, E., Masiello, S. N., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5855–5863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01361-12>
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47–56. www.pelagiarsearchlibrary.com
- Ribeiro Júnior, J. C., de Oliveira, A. M., Silva, F. de G., Tamanini, R., de Oliveira, A. L. M., & Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 75–83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>

- Saad, M. A., Ombarak, R. A., & Abd Rabou, H. S. (2019). Effect of nisin and lysozyme on bacteriological and sensorial quality of pasteurized milk. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 403–408. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f360>
- Schmidt, V. S. J., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S., & Wenning, M. (2012). Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 154(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.002>
- Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E., & Shioya, S. (1999). Nisin Production by a Mixed-Culture System Consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 65, Issue 7). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 45, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Susanto, M. (2017). *INFLUENCE OF NISIN TO THE LACTIC ACID BACTERIA GROWTH AND INFLUENCE OF NISIN TO THE LAB GROWTH AND MILK-CHEESE MADELEINE SUSANTO Thesis Submitted in Partial Fulfilment of The Requirements for.*
- Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2015). A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5806–5817. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9490>
- Twomey, E., Hill, C., & Field, D. (2021). Recipe for Success: Suggestions and Recommendations for the Isolation and Characterisation of Bacteriocins. *International Journal of Microbiology*, 2021(9990635), 1–19.
- Wang, L., Dekker, M., Heising, J., Zhao, L., & Fogliano, V. (2023). Food matrix design can influence the antimicrobial activity in the food systems: A narrative review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2205937>
- Wirjantoro, T. I., Lewis, M. J., Grandison, A. S., Williams, G. C., & Delves-Broughton, J. (2001). The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. *Journal of Food Protection*, 64(2), 213–219. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.2.213>
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipič, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G. G., Lambré, C., Leblanc, J., Lillegaard, I. T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., ... Gott, D. (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*, 15(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, 150, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.160>
- Ziyaina, M., Govindan, B. N., Rasco, B., Coffey, T., & Sablani, S. S. (2018). Monitoring Shelf Life of Pasteurized Whole Milk Under Refrigerated Storage Conditions: Predictive Models for Quality Loss. *Journal of Food Science*, 83(2), 409–418. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13981>



Detection of Pea and Spinach Adulteration in Pistachio Nuts using a Low-Cost Spectral Sensor

Bezza Türköz^{1,a}, Muhammed Mustafa Özçelik^{1,b}, Sebahattin Serhat Turgut^{1,2,c,*}

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta/Merkez, Türkiye

²Triem Arge ve Teknoloji A.Ş., Göller Bölgesi Teknokenti, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta/Merkez, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 15.04.2024 Accepted : 18.07.2024</p> <p>Keywords: Adulteration Chemometric methods PCA Deep learning Artificial Neural Networks</p>	<p>Pistachio is a product frequently used in many desserts, especially baklava. Especially ground pistachios are frequently subjected to adulteration due to their high demand and cost. Green peas and spinach are among the most counterfeited products by being mixed with pistachios due to their organoleptic properties, colour similarity and cheapness. However, when these products are mixed with ground pistachios at certain proportions, rapid and on-site detection of counterfeiting is often not possible by methods such as visual inspection. Therefore, the current study aims to detect the adulteration of green peas and spinach in pistachios using a low-cost spectral sensor technology and chemometric methods. In this context, green pea and spinach samples were mixed with pistachios at concentrations between 5-50% (w/w) in 5% increments. Reflectance spectra of pure pistachios and mixed samples were obtained between 410-940 nm. Deep learning method was used to train a model developed to detect fraud rates in samples. Principal Component Analysis was used for dimension reduction in the data fed to the model, and coefficient of determination (R^2), root mean square error ($RMSE$), and residual predictive deviation (RPD) statistics were used to test the goodness of fit of the regression problem. For training, validation and test data, R^2 was 0.85, 0.83, and 0.80; $RMSE$ was 5.81, 6.13, and 6.71; RPD was 2.55, 2.44, and 2.21, respectively. As a result of the findings, it has been revealed that the low-cost spectral sensor and the developed chemometric method have the potential to be used as a non-destructive, rapid and simple method for determining the adulteration rate of green peas and spinach in pistachios, especially above 10%.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2206-2215, 2024

Antep Fıstığında Bezelye ve Ispanak Tağışının Düşük Maliyetli Spektral Sensör Kullanılarak Tespiti

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 15.04.2024 Kabul : 18.07.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Tağış Kemometrik yöntemler PCA Derin öğrenme Yapay Sinir Ağları</p>	<p>Antep fıstığı, başta baklava olmak üzere birçok tatlıda sıkça kullanılan bir üründür. Özellikle öğütülmüş Antep fıstığı, talebin yüksek olması ve yüksek maliyeti nedeniyle sıklıkla tağışe maruz kalmaktadır. Yeşil bezelye ve ıspanak, organoleptik özellikleri, renk benzerliği ve ucuzluğu nedeniyle Antep fıstığı ile karıştırılarak en çok sahtecilik gerçekleştirilen ürünler arasındadır. Ancak bu ürünlerin öğütülmüş Antep fıstığına belirli oranlarda karıştırılması durumunda sahteciliğin hızlı ve yerinde tespiti, gözle muayene gibi yöntemlerle çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle mevcut çalışma, Antep fıstığındaki yeşil bezelye ve ıspanak tağışının, düşük maliyetli bir spektral sensör teknolojisi ve kemometrik yöntemler kullanılarak tespitini amaçlamaktadır. Bu kapsamda yeşil bezelye ve ıspanak örnekleri Antep fıstığı ile %5-50 (a/a) arasındaki konsantrasyonlarda %5'lik artışlarla karıştırılmıştır. Saf Antep fıstığı ve karışık numunelerin reflektans spektrumları 410-940 nm arasında elde edilmiştir. Numunelerdeki sahtecilik oranlarının tespiti amacıyla geliştirilen modelin eğitilmesinde derin öğrenme yöntemi kullanılmıştır. Modele beslenen verilerde boyut indirgeme amacıyla Temel Bileşenler Analizinden faydalanılmış olup, regresyon probleminin uyum iyiliğini test etmek amacıyla belirleme katsayısı (R^2), hata kareler ortalamasının karekökü ($RMSE$) ve artıklık tahminsel sapma (RPD) istatistikleri kullanılmıştır. Sırasıyla eğitim, doğrulama ve test verileri için R^2 0,85, 0,83 ve 0,80; $RMSE$ 5,81, 6,13 ve 6,71; RPD 2,55, 2,44 ve 2,21 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde, söz konusu ekonomik spektral sensör ve geliştirilen kemometrik yöntemin Antep fıstığında özellikle %10 üzerindeki yeşil bezelye ve ıspanak tağış oranının belirlenmesi için tahribatsız, hızlı ve kolay bir yöntem olarak kullanıma potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur.</p>

^a y12230119007@ogr.sdu.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-4777-8843>

^c ozcelik.m.mustafa@gmail.com

^d <https://orcid.org/0000-0002-1933-1737>

^e serhatturgut@sdu.edu.tr

^f <https://orcid.org/0000-0002-9968-4750>



Giriş

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) istatistiklerine göre, 2022 yılında dünyadaki toplam Antep fıstığı üretimi 1 milyon tonun üzerinde olup, ülkemiz yıllık yaklaşık 240 bin ton fıstık üretimi ile listede başı çeken ülkeler arasındadır (FAO, 2022). Antep fıstığı, çerez olarak tüketiminin dışında ülkemizde sucuk, hamur işleri ve tatlılar (özellikle baklava), soslar, çikolata ve dondurma ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın kullanılması ve yüksek maliyeti, Antep fıstığını özellikle toz halinde kullanıldığında art niyetli üreticiler tarafından tağşiş uygulanmasını cazip hale getirmektedir (SU, 2020; DHA, 2021). Bu bağlamda, Antep fıstığında gerçekleştirilen tağşişin belirlenmesi, tüketiciyi olumsuz etkileyen gıda sahtekârlığının önlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Bezelye ve ıspanak, görsel özelliklerinin benzer olması ve baskın olmayan organoleptik karakteristikleri nedeniyle Antep fıstığında sahtecilik gerçekleştirmek amacıyla en yaygın kullanılan bitkilerdir. Ayrıca bu ürünlerin maliyetlerinin Antep fıstığına kıyasla daha düşük olması, olası sahtecilik uygulamalarını daha çekici hale getirmekte ve gıda ürünlerinde kullanılan Antep fıstığının güvenilirliği konusunda endişelere sebep olmaktadır (Eksi-Kocak ve ark., 2016). Antep fıstığında gerçekleştirilen tağşiş, içerdikleri şeker, yağ ve diğer bileşenler nedeniyle özellikle tatlılarda veya Antep fıstığı ezmesi gibi ürünlerde, basit tat, doku veya görsel muayene ile tespit edilememektedir (Sezer ve ark., 2019).

Gıda ürünlerinde gerçekleştirilmiş olması muhtemel ve hem gıda güvenliği hem de kalite güvencesi için tespiti elzem olan tağşişin belirlenmesine yönelik farklı analitik teknikler bulunmaktadır. Yaygın olarak tercih edilen kromatografik ve spektroskopik metotların yanı sıra, bir takım enzimatik yöntemler ve elektronik burun gibi elektronik sensörlerin kullanımı da bilimsel literatürde kendisine yer bulmaktadır (Anagaw ve ark., 2024). Örneğin genetik ve jeokimyasal DNA parmak izi analizi (Zannella ve ark., 2017), floresan dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Campmajó ve ark., 2020), kütle spektroskopisi ile destekli sıvı veya gaz kromatografisi (Kendirici & Onoğur, 2011; Çavuş ve ark., 2018; Suman ve ark., 2021; Campmajó ve ark., 2023), mikrodalga ekstraksiyon destekli ve/veya UV dedektörlü HPLC (Campmajó ve ark., 2019; Kalogiouri ve ark., 2022) gibi ileri analitik yöntemler Antep fıstıklarında tağşiş tespiti amacıyla kendisine bilimsel literatürde yer bulabilmiştir. Söz konusu yöntemlerin hassasiyeti ve doğruluğu oldukça yüksek olmakla birlikte dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar arasında zaman alıcı ve iş gücü yoğun örnek hazırlama yöntemleri olmaları, laboratuvar alanı gereksinimi, eğitilmiş personel ve sarf malzemeleri nedeniyle ekonomik olarak daha az verimli olmaları, sonuçların elde edilmesi için daha uzun süre gerektirmeleri ve yıkıcı (tahribatlı) olmaları yer almaktadır (Lu, 2017). Bu nedenle Antep fıstıklarında bulunan muhtemel tağşişlerin tespiti için hızlı, ekonomik ve basit tespit yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

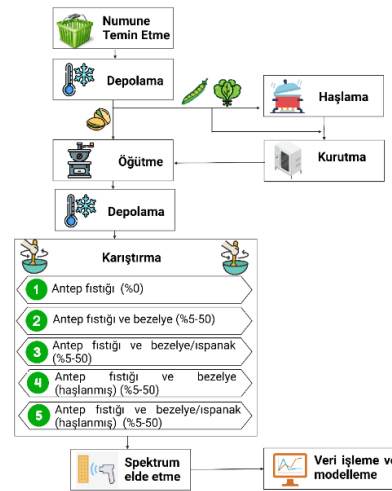
Gıda ürünlerinde tağşiş tespitinde hızlı ve tahribatsız sonuç üreten spektral sensörlerin kemometrik yöntemlerle birlikte kullanımı son dönemlerde yaygınlaşmaktadır (Edwards ve ark., 2021; Khan ve ark., 2021; Modupalli ve ark., 2021; Nobari Moghaddam ve ark., 2022; Turgut ve

ark., 2024). Benzer şekilde, kuruyemiş ve ürünlerinde sahteciliğin tespiti için çok sayıda çalışma mevcut olmakla birlikte (Teixeira & Sousa, 2019; Vega-Castellote ve ark., 2024), Antep fıstıklarında gerçekleştirilmesi muhtemel sahteciliğin hızlı ve tahribatsız tespitini konu edinen sınırlı sayıda çalışma tespit edilebilmiştir. Örneğin, kemometrik yöntemlerle birlikte FT-MIR ve FT-NIR (Aykas & Menevseoglu, 2021), NIR ve MIR (Temizkan ve ark., 2020; Genis ve ark., 2021), Raman hiperspektral görüntüleme (Eksi-Kocak ve ark., 2016) ve bilgisayar gözü (Çınarer ve ark., 2024) gibi spektral yöntemler, Antep fıstıklarında gerçekleştirilen sahteciliğin tespiti amacıyla denenmiştir. Söz konusu yöntemlerle yüksek doğruluğa sahip tahminler üretilebilmekle birlikte, kullanılan sensör sistemleri genellikle yüksek maliyetlidir ve/veya örneklerin yerinde analizine imkân verecek düzeyde taşınabilir değildir. Bu olumsuzlukların giderilerek, rutin analizlerin sıklaştırılması ve denetleme mekanizmalarının daha yaygın uygulanabilmesi için hem uygun maliyetli hem de gerçek anlamda taşınabilir (cep boyutunda) tağşiş tespit yöntemlerinin geliştirilmesi, gıda kalitesi ve güvenliğinin temini için büyük önem arz etmektedir.

Bu bağlamda mevcut çalışmanın amacı, farklı oranlarda bezelye ve/veya ıspanak karıştırılarak hazırlanan Antep fıstığı örneklerindeki sahtecilik oranlarının herhangi bir örnek hazırlığı olmadan ve tahribatsız bir şekilde belirlenmesi için kullanımı kolay, düşük maliyetli ve taşınabilir bir spektroskopik cihazın (triSens PT-01, Triem Arge ve Teknoloji, Isparta, Türkiye) potansiyelinin değerlendirilmesidir.

Materyal ve Yöntem

Antep fıstığı örneklerinde gerçekleştirilmesi muhtemel bezelye ve ıspanak ilavesi ile sahteciliğin tespiti amacıyla mevcut çalışma kapsamında gerçekleştirilen örnek hazırlama, spektrum okuma ve veri analizi basamakları aşağıda detaylandırılmış olup, ayrıca özet gösterimi Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1 Saf Antep fıstığı ve tağşiş uygulanmış (bezelye ve ıspanak ilaveli) Antep fıstığı numunelerinin tahribatsız tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmanın özet şematik gösterimi
Figure 1 Schematic representation of the study carried out for the non-destructive detection of pure pistachio and adulterated (pea and spinach added) pistachio samples

Örnek Hazırlama

Antep fıstığı numuneleri Gaziantep ilinde faaliyet gösteren ulusal bir firmadan temin edilmiş olup, bezelye ve ıspanak örnekleri Isparta'da faaliyet gösteren yerel bir marketten dondurulmuş olarak satın alınmıştır. Ham maddelerin nem miktarı, nem tayin cihazı (DBS 60-3, Kern, Almanya) kullanılarak gravimetrik yöntemle tespit edilmiştir. Bu amaçla numuneler 105°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş olup, örneklerin nem içeriği "g nem/100 g numune" olarak hesaplanmıştır.

Analiz sonucunda Antep fıstığı numunelerinin nem içeriği %3,85±0,05 bulunmuş olup, yeniden kurutma uygulanmamıştır. Ancak ıspanak ve bezelye numunelerinin nem içeriklerini, Antep fıstığı numunelerinin sahip olduğu nem seviyesine düşürmek amacıyla kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutma işleminden önce bezelye ve ıspanak numuneleri iki gruba ayrılmıştır. Bir grup doğrudan kurutmaya tabii tutulurken, diğer grup kurutmada işleminden önce 1 dk kaynar su içerisinde bekletilmiştir. Kurutma işlemleri 65°C sıcaklıkta havalı döner kurutucuda (TK-LAB, EKSİS Makine, Isparta, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi süresince numunelerin nem miktarı düzenli aralıklarla takip edilerek, nihai nem oranının %3-4 seviyesine erişmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmadan önce kurutulan numunelerin oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiştir.

Boz Antep fıstığı, kurutulmuş bezelye ve ıspanak örnekleri bir değirmen (KSPG-4812, Kiwi, Çin Halk Cumhuriyeti) yardımıyla öğütülmüştür. Ardından öğütülmüş örnekler eleme uygulanarak boyutlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyutlandırma eleklerinden geçirilen örnekler, büyüklüklerine göre sırasıyla (i) 2 mm'den büyük, (ii) 1 mm'den büyük, (iii) 0.5 mm'den büyük ve (iv) 0.5 mm'den küçük olmak üzere tanecik boyutuna göre dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Boyutlandırılan örnekler içerisinde 1 mm'den büyük tanecik boyutuna sahip örnekler ayrılarak nem geçirme direnci yüksek materyal içerisinde vakum ambalaj uygulanmıştır. Numuneler analizlere kadar vakum ambalaj içerisinde, karanlıkta ve buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Öğütülmüş örnekler spektral ölçümlerden hemen önce farklı oranlarda karıştırılarak okumaya hazır hale getirilmiştir. Bu amaçla ham Antep fıstığı dışında dört farklı örnek grubu oluşturularak olası gıda sahteciliği taklit edilmeye çalışılmıştır. Oluşturulan örnek grupları şöyledir:

(i) Antep fıstığı:bezelye (haşlanmamış) karışımı, (ii) Antep fıstığı:bezelye (haşlanmış) karışımı, (iii) Antep fıstığı:bezelye:ıspanak (haşlanmamış ve 1:1 bezelye:ıspanak karışım oranı) karışımı ve (iv) Antep fıstığı:bezelye:ıspanak (haşlanmış ve 1:1 bezelye:ıspanak karışım oranı) karışımı. Bezelye ve bezelye:ıspanak karışımları (1:1), ham Antep fıstığına %5-50 (a/a) arasında değişen ve %5'lik aralıklarla artan 10 farklı oranda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım oranları Tablo 1'de sunulmuştur.

Spektrumların Elde Edilmesi ve Verilerin Analizi

Hazırlanan örnekler için spektral reflektans değerleri 410-940 nm arasında ve 18 farklı dalga boyunda elde edilmiştir. Bu amaçla düşük maliyetli ve taşınabilir bir spektral sensör (triSens PT-01, Triem Arge ve Teknoloji, Isparta, Türkiye) kullanılmıştır. Söz konusu sensör tarafımızca geliştirilmiş olup, prototip geliştirme maliyeti yaklaşık 100 Amerikan doları seviyesindedir. Hazırlanan numuneler, Şekil 2'de gösterildiği üzere sensör haznesine doldurularak otomatik olarak sıralı 5 ölçüm alınmış ve bu spektrumların ortalaması (R) geliştirilen yazılım tarafından ilgili örneğe ait tek okuma olarak kaydedilmiştir. Bu şekilde her örnekten 10 okuma gerçekleştirilmiş olup, toplam 410 spektrum elde edilmiştir. Spektrumlar, log(1/R) olarak kaydedilmiştir. Veri setinde bulunan spektrumlar, hammaddelere uygulanan ön işlemlere göre ayrıştırılmadan, tek bir veri seti olarak ele alınarak, veri analizi ve model geliştirme süreçleri işletilmiştir.

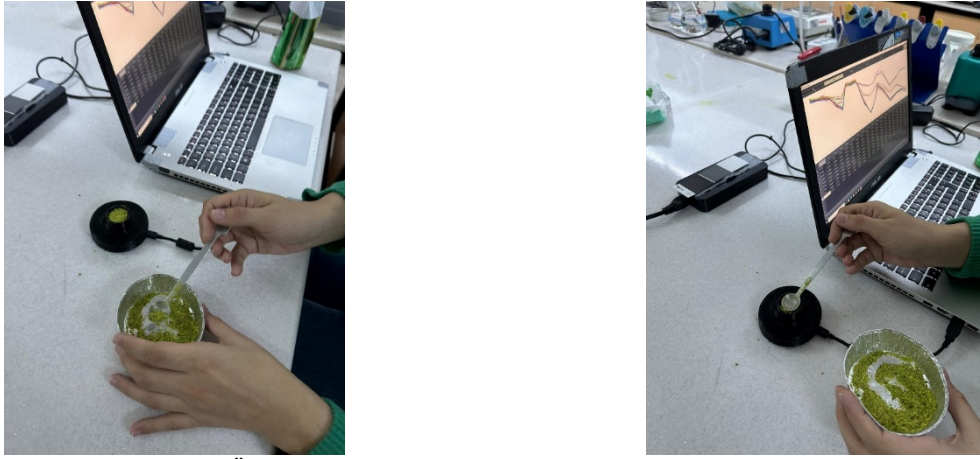
Elde edilen spektrumların analizi (veri ön işleme, aykırı verilerin incelenmesi, model geliştirme dahil olmak üzere) Python programlama dilinde (v3.9, Python Software Foundation, ABD) ve ilgili kütüphaneler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin ön işlenmesi amacıyla MinMax Normalizasyonu kullanılmış olup, spektral veriler -1 ilâ +1 aralığına ölçeklendirilmiştir. Aykırı verilerin tespitinde Shenk & Westerhaus (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla MinMax Normalizasyonu gerçekleştirilmiş verilere Temel Bileşenler Analizi (PCA) uygulanmıştır. Ardından toplam varyansın %99'undan fazlasını açıklayabilen ilk 10 temel bileşen skorları kullanılarak her örneğe ait Mahalanobis mesafesi (H) hesaplanmıştır. H istatistiklerinin standart normal dağılım gösterdiği kabul edilmiş olup, kritik değerden ($p=0.01$, ortalama + 3 × standart sapma) daha yüksek H değerine sahip olan örnekler olası aykırı değerler olarak ele alınmıştır.

Tablo 1. Hazırlanan karışım oranları

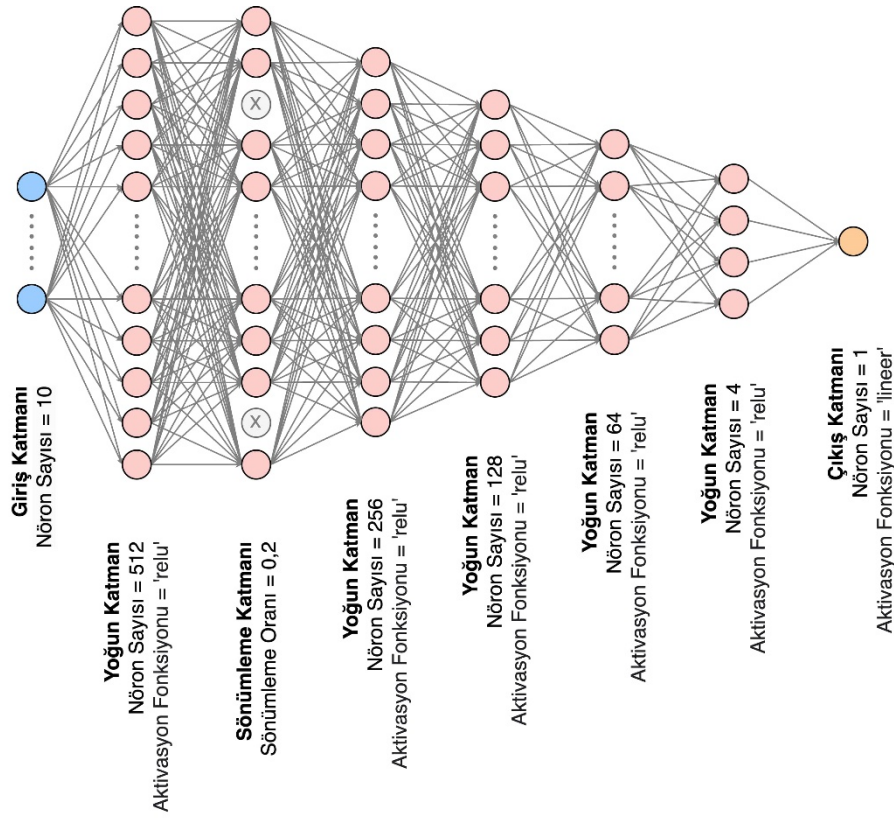
Table 1. Prepared mixture ratios

Hile oranı	Örnek Karışım Oranları				
	Yalnızca B Sahteciliği		B ve I Sahteciliği		
	F	B	F	B	I
%0	1	0	1	0	0
%5	0,95	0,05	9,5	0,025	0,025
%10	0,9	0,1	0,9	0,05	0,05
%15	0,85	0,15	0,85	0,075	0,075
%20	0,8	0,2	0,8	0,1	0,1
%25	0,75	0,25	0,75	0,125	0,125
%30	0,7	0,3	0,7	0,15	0,15
%35	0,65	0,35	0,65	0,175	0,175
%40	0,6	0,4	0,6	0,2	0,2
%45	0,55	0,45	0,55	0,225	0,225
%50	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25

- F: Antep fıstığı, B: bezelye, I: ıspanak; - Tabloda sunulan sahtecilik oranları haşlanmamış/haşlanmış bezelye ve ıspanak için ayrı ayrı hazırlanmıştır.



Şekil 2 Örneklerin sensöre aktarılması ve spektrum elde edilmesi
Figure 2 Transferring the samples to the sensor and obtaining spectra



Şekil 3. Eğitilen derin sıralı öğrenme yapay sinir ağları modeli yapısı
Figure 3. Structure of the trained deep sequence learning artificial neural networks model

Numunelerdeki sahtecilik oranının belirlenmesi bir regresyon problemi olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla geliştirilecek olan modelin eğitilmesi için derin sıralı öğrenme yapay sinir ağları modeli tercih edilmiştir. İlk olarak MinMax Normalizasyonuna tabi tutulan verilere PCA uygulandıktan sonra ilk 10 temel bileşene ait eksen skorları rastgele ve tabakalama uygulanarak eğitim (%80) ve doğrulama (%20) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Bunlardan eğitim verisi ile model eğitimi sağlanırken, doğrulama verisi yardımıyla kullanılan optimizasyon yöntemi, epok sayısı, her epoktaki iterasyon adedi, öğrenme hızı gibi model hiper parametreleri optimize edilmiştir. Bu esnada model uyum iyiliği istatistiği olarak hata kareler ortalamasının karekökü (*RMSE*) kullanılmıştır.

Eğitilen modelin yapısı Şekil 3'te sunulmuş olup, sırasıyla 10 nörondan oluşan bir giriş katmanı, 512 nörondan oluşan bir yoğun katman, %20 oranında sönümlenme gerçekleştiren bir sönümlenme katmanı, sırasıyla 256-128-64-4 nörondan oluşan 4 yoğun katman ve tek nörondan oluşan bir çıkış katmanından meydana gelmektedir. Yoğun katmanlarda "relu" aktivasyon fonksiyonu kullanılırken, çıkış katmanında "linear" aktivasyonu fonksiyonu yer almaktadır.

Eğitilen modelin tahmin kabiliyetini değerlendirmek amacıyla eğitim ve doğrulama örnekleri dışında, yeniden ham madde temin edilmesiyle baştan farklı oranlarda karıştırılan örnekler hazırlanarak, toplam 165 adet harici doğrulama (test) verisi elde edilmiştir.

Tüm aşamalarda (eğitim, doğrulama, test) model uyum iyiliğinin değerlendirilmesi amacıyla belirleme katsayısı (R^2), hata kareler ortalamasının karekökü ($RMSE$) ve artıklık tahminsel sapma (RPD) istatistikleri kullanılmıştır. Bahsi geçen verilerin eşitlikleri aşağıda verilmiştir (Eşitlik 1-2).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad (1)$$

$$RPD = \frac{SD}{RMSE} \quad (2)$$

Yukarıda sunulan eşitliklerde y_i ve \hat{y}_i , gözlemlere ait gerçek ve tahmini değerlerini; N , gözlem sayısını ve SD , standart hatayı ifade etmektedir.

Bulgular ve tartışma

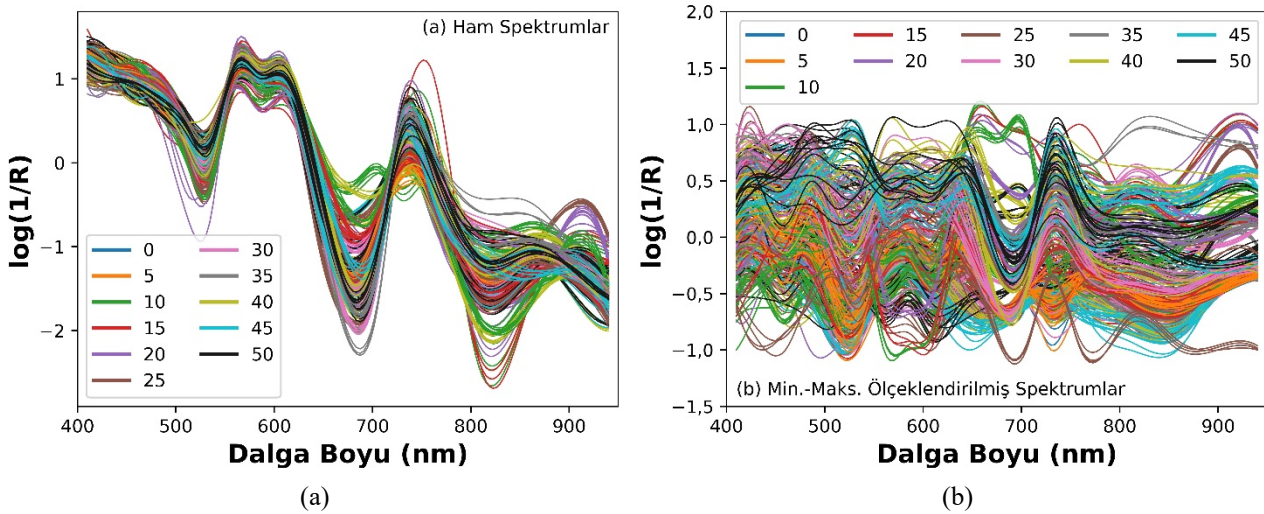
Spektral Karakterizasyon

Tağşiş uygulanmış ve uygulanmamış Antep fıstığı numunelerine ait 410-940 nm arasındaki 18 dalga boyunda elde edilmiş reflektans spektrumları ($\log(1/R)$), Şekil 4-a'da sunulmuştur. Bilindiği üzere kemometrik yaklaşımlarda verilerin birbirlerinden ayrıştırılması, doğrusallaştırılması ve boyut indirgeme amacıyla PCA sıklıkla uygulanmaktadır (Bro & K. Smilde, 2014). Ancak PCA yöntemi verilerin normal dağılıma sahip olduğu varsayımına dayanmaktadır ve verilerdeki varyans farklılıklarından oldukça etkilenmektedir. Bu nedenle PCA işleminden önce verilerin ölçeklendirilmesi (standardizasyonu veya normalizasyonu) gerekmektedir (Walach ve ark., 2018). Mevcut çalışmada veriler MinMax Normalizasyon işlemi uygulanmış olup, spektrumlar Şekil 4-b'de gösterilmektedir.

Saf fıstık ile tağşiş uygulanmış Antep fıstığı örneklerine ait PCA Skor grafikleri Şekil 5-a'da sunulmuştur. PCA analizi sonuçlarına göre ilk iki temel bileşen (PC1 ve PC2) sırasıyla %58,38 ve %25,67 olmak üzere toplam varyansın yaklaşık %85'ini izah edebilmektedir. Ekski-Kocak ve ark. (2016), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı Antep fıstığı ve bezelye örnekleri arasında meydana gelen varyasyonları

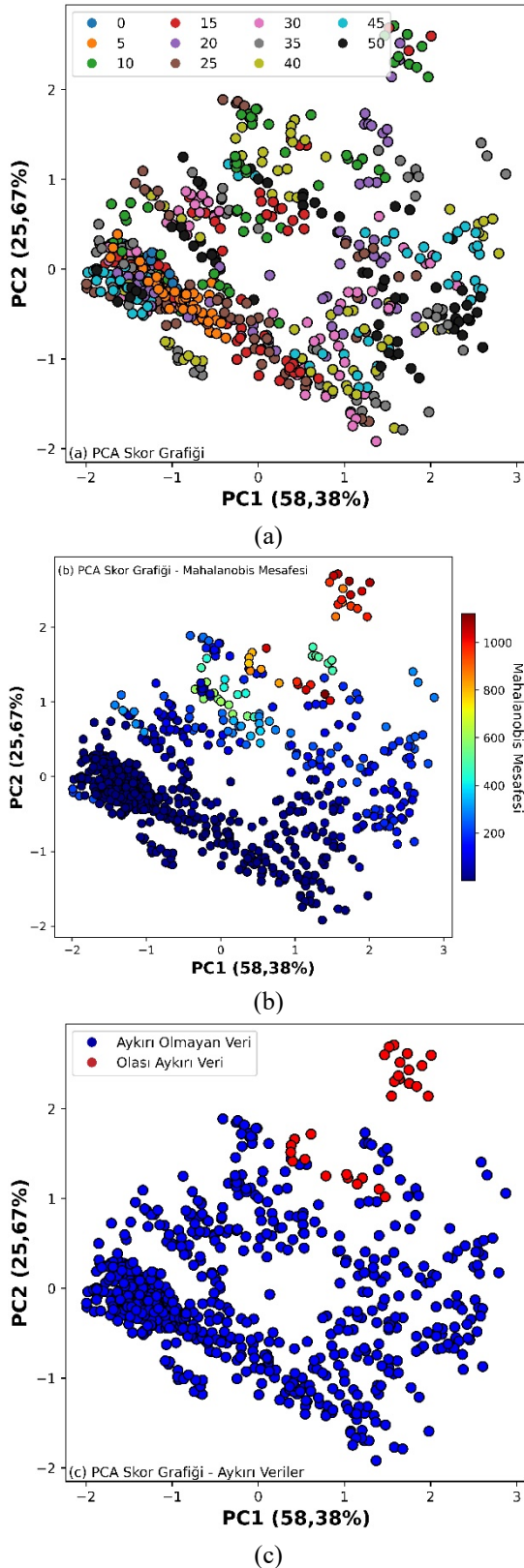
görselleştirmek için PCA yönteminden yararlanılmıştır. Numuneler arasındaki ayrım, tüm spektral aralığı (2703-50000 nm) kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PC1 ile toplam varyansın %95,79'unu açıklanırken, PC2 ile toplam varyansın %3,99'unu açıklanmıştır. Böylece PCA grafiği ile, Antep fıstığı ve yeşil bezelye numuneleri arasında büyük bir mesafe olduğu ve bunun başarılı bir ayrımın göstergesi olduğu rapor edilmektedir. PCA tekniği, veriler arasındaki doğrusal ilişkilerin kuvvetli olması durumunda daha iyi ayrışma ortaya koyabilmektedir. Ancak aksi durumda örnekler arasında belirgin gruplaşmalar görülememektedir (Yuille, 2014). Şekil 5-a'da sunulan farklı oranlarda tağşiş içeren örnekler arasında bazı gruplaşmalar olsa dahi, net bir ayrım mevcut değildir. Bu durum söz konusu regresyon probleminin doğrusal olmayan yöntemlerle ele alınması gerektiğini işaret etmektedir. Ayrıca mevcut teknolojiyle 18 farklı dalga boyunda ölçüm sağlayan sensörün, düşük dalga boyu çözünürlüğü ve taradığı dalga boyu aralığının görece dar olması, PCA sonucunda net bir ayrışma sağlanamamasının bir diğer nedeni olabilir. Ancak bu özelliklerin zaman içerisinde iyileştirilmesiyle, sensörden elde edilen verinin artırılması, PCA vb. istatistiksel analizlerle daha iyi sonuçlar alınmasına yardımcı olacaktır.

PCA ayrıca, H istatistiği ile birlikte olası aykırı verilerin tespiti için kullanılmıştır. Şekil 5-b'de PCA skor grafiği üzerine işlenmiş olan H istatistikleri ve Şekil 5-c'de olası aykırı veriler sunulmuştur. Numunelerin kümelenebilirliğini görüntülemek için ilk 2 temel bileşen kullanılırken, H istatistiklerinin hesaplanması ve olası aykırı verilerin işaretlenmesinde ilk 10 temel bileşen skorlarından faydalanılmıştır. Çok değişkenli düzlemde H mesafesi, kümenin şekli (kovaryansı) dikkate alınarak her gözlemin veri kümesinin merkezinden uzaklığı şeklinde ifade edilmektedir. Ayrıca bu değer ne kadar büyük olursa, ilgili veri noktasının aykırı değer olma olasılığı o kadar artmaktadır (Holbert, 2022). Mevcut çalışma kapsamında ise ortalama H mesafesine 3 standart sapma eklenmiş değerden daha büyük H mesafesine sahip olan örnekler, olası aykırı veriler olarak etiketlenmiştir. Ancak söz konusu olası aykırı örnekler için değerler incelendiğinde, bunların belirli örnekler için oldukları ve veri setinde korunması gerektiğine kanaat getirilmiştir.



Şekil 4. (a). Saf ve tağşiş uygulanmış Antep fıstığı örneklerinin reflektans spektrumları ve (b). MinMax Normalizasyonu ile ölçeklendirilmiş reflektans spektrumları (Grafik göstergelerinde 0-50 arasında değerler Antep fıstıklarına gerçekleştirilen tağşiş oranlarını temsil etmektedir.)

Figure 4. (a) Reflectance spectra of pure and adulterated pistachio samples, and (b). reflectance spectra scaled with MinMax Normalization (Values between 0-50 in the graphic indicators represent the adulteration ratio of pistachios.)



Şekil 5. (a) PCA skor grafiği (Grafik göstergesinde 0-50 arasında değerler Antep fıstıklarına gerçekleştirilen taşıyıcı oranlarını temsil etmektedir.), (b). Mahalanobis mesafesini gösterir PCA skor grafiği ve (c) olası aykırı değerleri gösterir PCA skor grafiği

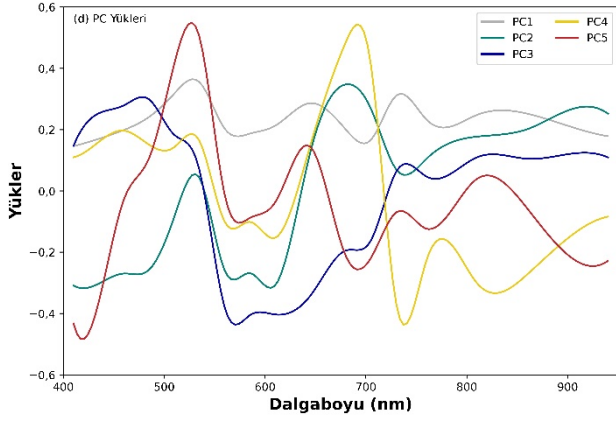
Figure 5. (a) PCA score graph (Values between 0-50 in the graph display represent the adulteration ratios of pistachios.), (b.) PCA score graph showing the Mahalanobis distance and (c) PCA score graph showing possible outliers

PCA ile elde edilen grafiklerin yorumlanması ve eksen skorlarının anlaşılması, az sayıda örnekle çalışılıyor ve örnek gruplarına göre etiketleme mevcut ise daha kolay olabilmektedir. Ancak sınıflar bilinmiyorsa veya beklenmedik kümeler tespit edilirse grafiğin yorumlanması zorlaşabilmektedir (Ivosev ve ark., 2008). Çünkü başlangıç değişkenlerinin doğrusal kombinasyonlarını temsil eden temel bileşen değerleri, ilgili değişkenler için gerçek hayatta sayısal bir anlam taşımamaktadır. Bu nedenle yorumlamak güçtür. Fakat her değişkenin bir temel bileşen üzerindeki yükleri incelenerek, bağımsız değişkenlerin her bir bileşene sağladığı katkı analiz edilebilir. Yükler sayısal açıdan bakıldığında değişkenlerin katsayılarına eşit olup, hangi değişkenlerin bileşenlere en büyük katkıyı sağladığı hakkında bilgi vermektedir. Yüksek mutlak yük değerleri (-1 veya +1'e doğru), değişkenin bileşeni güçlü bir şekilde etkilediğini ve 0'a yakın yük değerleri ise değişkenin bileşen üzerinde zayıf bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yükleme işaretinin yönü (- veya + olması), bir değişken ile bir temel bileşenin pozitif veya negatif ilişkisini ifade etmektedir (Taskesen, 2023).

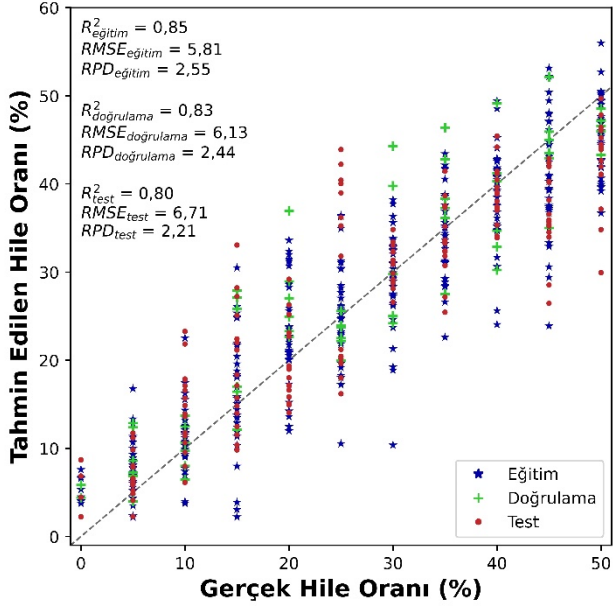
Şekil 6, saf Antep fıstığı ve katkılı numunelerin normalize edilmiş spektrumları üzerinde gerçekleştirilen PCA'dan elde edilen ilk 5 temel bileşen (PC1-5) üzerindeki yüklemeleri göstermektedir. Buna göre, elde edilen spektrumlardaki reflektans değerleri ve PC yüklemelerinin, örneklerde mevcut olan pigmentlere ve O-H, C-H veya N-H fonksiyonel gruplarının gerilme titreşimlerine bağlı olarak ortaya çıktığı söylenebilir. Bu fonksiyonel gruplar, genellikle şekerler ve asitlerin konsantrasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Cen & He, 2007; Mohammadi-Moghaddam ve ark., 2018). Örneğin, 400-700 nm arasında beliren piklerin, örneklerdeki Antep fıstıklarında var olan pigmentlerle ilişkili olduğu düşünülebilir. Yaklaşık 470 nm civarında beliren pikler karotenoidler ile ilişkilendirilirken, antosiyaninler ise yaklaşık 535-555 nm dalga boyu aralığında birden fazla pik gösterebilmektedir (Mohammadi-Moghaddam ve ark., 2018). Ayrıca yaklaşık 525 ve 660 nm dalga boylarında elde edilen yüklerin, numunenin rengi ile ilişkili olduğu ifade edilebilir (Ghosh ve ark., 2015). Söz konusu dalga boyu aralığında bulunabilen 601, 631 ve 634 nm civarında bulunan piklerin klorofil-b, 651 ve 696 nm dalga boyu seviyesinde bulunan yüklerin ise klorofil-a kaynaklı olduğu bilinmektedir (Mohammadi-Moghaddam ve ark., 2018). Meulebroeck & Thienpont (2006) ve Kavdir ve ark. (2007), 660 ve 680 nm dalga boyunda elde edilen reflektansların, örneklerde var olan klorofil ile ilişkilendirilebileceğini daha önce rapor etmişlerdir. Ayrıca NIR bölgesinde, 750 ve 925 nm civarında PC1-5'te görülen pikler, sırasıyla C-H'nin dördüncü aşırı ton ve üçüncü aşırı ton ile ilişkilendirilebilir. N-H'nin üçüncü aşırı tonunun 790, 820 ve 840 nm civarında reflektans gösterdiği bilinmektedir. 860 nm, 922 nm ve 940 nm'ye kadar olan piklerin ise aromatik gruplardaki CH bağından, C-H'nin üçüncü aşırı tonundan ve su moleküllerinden kaynaklanabileceği bilinmektedir (Cen & He, 2007; Mohammadi-Moghaddam ve ark., 2018).

Mevcut çalışmada ölçülen spektrum aralığının dışında kalmakla birlikte ilgili literatürde 1209, 1724, 1761, 2309 ve 2350 nm dalga boylarına elde edilen değerlerin yağ asitleri veya yağ içeriği (Fox & Cruickshank, 2005), 1690, 1728 ve 1780 nm civarında karbonhidratların C-H

bağlarının gerilme titreşim noktası (Kelly ve ark., 2006), 2148 nm civarındaki değerlerin proteinler ve 1458 nm civarındaki değerlerin O-H aşırı ton bağıyla ilişkili olabileceği yapılan farklı çalışmalarda belirtilmiştir (Sundaram ve ark., 2009).



Şekil 6 Temel bileşen yükleme grafiği
Figure 6 Principal component loading chart



Şekil 7. Tağşiş uygulanmış ve uygulanmamış Antep fıstığı örneklerindeki hile oranları için gerçek değerler ile model tahminlerinin karşılaştırılması

Figure 7. Comparison of actual values and model predictions for adulteration ratios in adulterated and unadulterated pistachio samples

Derin Öğrenme Modeli

Öğütülmüş Antep fıstığı örneklerindeki tağşiş düzeyinin tespiti bir regresyon problemi olarak ele alınmış olup, bu amaçla derin sıralı öğrenme yapay sinir ağı modeli eğitilmiştir. Eğitim esnasında daha önce de belirtildiği üzere farklı model yapıları ve hiper parametre kombinasyonları test edilmiştir. Hem eğitim hem de doğrulama veri seti için en iyi model uyum iyiliği istatistikleri 10^{-5} öğrenme hızı ile Adam optimize edici ve epok adım sayısı 20 olan 1000 epokluk bir eğitim sonucunda elde edilmiştir. Model eğitimi esnasında aşırı ve yetersiz öğrenme sorunları olmamasına özen gösterilmiştir. Söz konusu modelin uyum iyiliği, tahmin ve

test sonuçları Şekil 7'de sunulmuştur. Buna göre öğütülmüş Antep fıstığı örneklerindeki tağşiş içeriğinin tahmin edilmesi amacıyla eğitilen derin öğrenme modeline ait uyum istatistikleri $R^2_{eğitim}=0,85$ ve $RMSE_{eğitim}=5,81$, doğrulama istatistikleri ise $R^2_{doğrulama}=0,83$ ve $RMSE_{doğrulama}=6,13$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca test için yeni ham maddeler temin edilerek, baştan hazırlanan örneklerde model performansı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak test istatistikleri $R^2_{test}=0,80$ ve $RMSE_{test}=6,71$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen modelin çok yüksek tahmin doğruluğuna sahip olmamakla birlikte, kullanıma amacı uyarınca tatmin edici doğrulukta tahminler üretebileceğine işaret etmektedir.

R^2 ve $RMSE$ haricinde RPD istatistiği de kemometrik modellerinin performansı ve uygulamada kullanılabilirliği hakkında önemli fikir veren oldukça anlamlı ve dikkat çekici bir metriktir. Geliştirilen modellere ait RPD değerleri eğitim, doğrulama ve test verileri için sırasıyla $RPD_{eğitim}=2,55$, $RPD_{doğrulama}=2,44$ ve $RPD_{test}=2,21$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde farklı kaynaklarda RPD değeri hakkında çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Örneğin, Williams (2001) ve Bellon-Maurel ve ark. (2010), RPD değerinin 2'den büyük olmasının, modelin uygulamada kullanılabilir ve stabil tahmin kabiliyetine sahip olduğunu belirttiğini ifade etmektedir. Kısaca, böyle bir model, ilgili referans değişkenini doğru bir şekilde tahmin etmek için kullanılabilir. RPD değerinin 1,4-2 arasında olması, modelin tarama amacıyla kullanılabilirliğini ve geliştirilebileceğini ifade ederken, RPD değerinin 1,4'ten küçük olması durumunda modelin güvenilir olarak kabul edildiği belirtilmektedir. Ancak Williams ve ark. (1993), RPD değerinin 10'dan büyük olmasının mükemmel tahmin kabiliyetine işaret ettiğini (referans kimyasal metotlarla eş değer veya daha iyi), 5-10 arası RPD değerlerinin kalite kontrol amaçlı kullanılabilir bir modele işaret ettiğini, 2,5'ten büyük RPD değerlerine sahip modellerin tarama amaçlı kullanılabilirliğini ve 1 RPD değerine sahip bir modelin ise kullanılamaz olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, bu sayısal aralıkların istatistiksel bir temele dayanmaması nedeniyle, RPD değerinin mevcut verinin dağılımı ve modelin kullanım amacına göre değerlendirilmesi gerektiği, dolayısıyla düşük RPD değerine sahip modellerin de güvenilir sonuçlar almak üzere kullanılabilirliği yine Bellon-Maurel ve ark. (2010) tarafından not edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında ve eğitilen modele ait diğer istatistikler birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada eğitilen ve 2 RPD değerinin üzerinde tahmin üretebilen modelin, referans bir analiz güvenilirliğinde olmamakla birlikte, analiz edilen ürün hakkında genel bir kanyaya ulaşmak amacıyla ve özellikle saha taramalarında kullanılabilirliği görülmektedir.

Her ne kadar geliştirilen model, RPD değerleri ve diğer model metrikleri incelendiğinde kabul edilebilir performans sergilemiş olsa da bazı olumsuzlukları da mevcuttur. Örneğin, model tahminlerinin, özellikle gerçekleştirilen hile oranı %10 ve üzerinde ise daha güvenilir olduğu söylenebilir. Çünkü, saf Antep fıstığı örneklerinde sahtecilik oranı %0 olması gerekirken, %5 seviyesinin biraz altında tespit edilmiştir ve bu, gerçek yaşam uygulamalarında yanıltıcı sonuçlar üretebilir. Böyle bir durumda, %5 seviyesinde sahtecilik olan örnekler saf Antep fıstığı olarak veya saf Antep fıstığı numuneleri düşük miktarda tağşiş gerçekleştirilmiş olarak

değerlendirilebilir. Bu nedenle mevcut sensör teknolojisi, Antep fıstığı numunelerinde gerçekleştirilmiş olması muhtemel sahtecilikleri analitik doğrulukla belirlemek amacıyla değil, özellikle hızlı ve ekonomik bir tarama gerektiren saha denetimlerinde ilk tetkik amacıyla değerlendirilebilir. Cihazın oldukça küçük boyutu nedeniyle kolayca taşınabilir olması da buna imkân tanımaktadır. Böylece geliştirilen teknoloji sayesinde üretim alanında, anında ve tahribatsız olarak taranan örneklerde tağşiş olup olmadığı hakkında genel bir kanı elde edilip, kabaca %10'dan daha yüksek miktarda tağşiş tespit edilen örnekler şüpheli olarak etiketlenip, kesin sonuç elde etmek amacıyla referans laboratuvarlara gönderilebilir. Öte yandan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2019 yılında yayımlanan kamuoyu duyurusunda Antep fıstığında sahtecilik yapan bir işletmenin, yaklaşık %40 düzeylerinde sahtecilik gerçekleştirdiği görülebilmektedir (TOB, 2019). Bu da potansiyel tağşişlerin daha büyük kârlar elde etmek amacıyla, %1-10 gibi düşük düzeylerde yapılmasının pek olası olmadığını düşündürmektedir.

Mevcut çalışma dışında ilgili literatürde Antep fıstığında uygulanması muhtemel sahteciliklerin kemometrik yöntemlerle belirlenmesini konu alan az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi Antep fıstıklarına yeşil bezelye ve ıspanak karıştırılmasını ele almıştır. NIR sensör teknolojilerinden faydalanılan çalışmada, fıstık örneklerinin kantitatif analizini iki farklı En Küçük Kısmî Kareler Regresyonu (PLSR) modeli kullanarak başarılı (bezelye için doğrulama değerleri; $R^2=0,99$, $RMSE=7,87$ ve ıspanak için $R^2=0,99$, $RMSE=4,69$) bir şekilde gerçekleştirmiştir (Geniş ve ark., 2021). Bir başka çalışmada Antep fıstığına bezelye ve yer fıstığı karıştırılmasının belirlenmesi için Raman hiper spektral görüntüleme kullanılmıştır. Elde edilen veriler PCA ve PLSR yöntemleri ile işlenerek yüksek tahmin başarısı ($R^2=0,99$, $RMSE=0,05$) elde edilmiştir (Eksi-Kocak ve ark., 2016). Aykas ve Menevseoglu (2021), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Antep fıstığı örneklerinde yer fıstığı ve bezelye tağşişini belirlemede FT-NIR ve FT-MIR spektroskopisi kullanılmıştır. Modelleme için PLS, PCA ve SIMCA (Yumuşak Bağımsız Sınıf Analoji Modellemesi) yöntemlerinden yararlanılmıştır. SIMCA, PCA uygulandıktan sonra her sınıf için bir güven bölgesine dayanan danışmanlı örüntü tanıma tekniklerinden birisidir (De Maesschalck ve ark., 1999). Spektral karmaşıklık nedeniyle anlamlı bilgi elde etmek için kullanılmaktadır. FT-NIR ve FT-MIR spektrometreleri birbirleri ile karşılaştırıldığında minimum örnekler arası sınıfsal mesafe değerleri (ICD) sırasıyla 13,6 ve 3,5 olarak hesaplanmıştır. FT-NIR'da ICD değerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. NIR ve MIR referans değerleri ile tahmin edilen değerler arasındaki farkı tespit etmek için standart tahmin hatası (SEP) değeri kullanılmış olup, yer fıstığı ve bezelye için FT-MIR modellerinde SEP değerleri sırasıyla %2,48 ve %2,51 olarak, FT-NIR modellerinde ise SEP değerleri sırasıyla %1,85 ve %0,7 olarak tespit edilmiştir. Bu şekilde saf ve katkılı numuneler arasında farklı kümelenmeler elde edilebilmiştir. En başarılı ayrıştırmanın FT-NIR spektroskopisi ile sağlandığı bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ise Antep fıstığında bezelye tağşişinin tespiti NIR ve MIR spektroskopisi kullanarak test edilmiştir. Örneklerdeki yeşil bezelye

oranının nicel tahminleri PLSR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NIR ve MIR kullanılan durumlar için sırasıyla 5,7 ve 1,6 RPD elde edilmiştir. Özetle en iyi tahmin kabiliyetine sahip modelin PLSR ve NIR (1216-2500 nm) kullanarak elde edildiği rapor edilmiştir (Temizkan ve ark., 2020).

Literatürde bulunan yayınlarda kullanılan birçok farklı cihaz ile yüksek tahmin başarıları elde edilmesine rağmen, bu cihazların yüksek maliyetleri nedeniyle uygulamada rutin olarak kullanılmaları ve özellikle küçük işletmeler tarafından temin edilmeleri oldukça zordur. Buna karşın mevcut çalışmada kullanılan cihazın daha dar bir dalga boyu aralığında tarama gerçekleştirmesine ve dalga boyu çözünürlüğünün düşük olmasına rağmen, çok düşük maliyeti saha taramalarında kullanılabilecek düzeyde tahmin kabiliyeti ve bir cebe sığabilecek kadar küçük boyutu sayesinde kazandığı yüksek taşınabilirliği dikkate alındığında, uygulamada ilk tetkik ve ürün hakkında fikir vermesi için rutin analizlerde kullanılma potansiyeline sahip olduğu ifade edilebilir. Fakat ölçüm alınan örneklerin kimyasal yapısı hakkında daha çok bilgi edinebilmek ve kalibrasyon modeli performansını geliştirebilmek için hem mevcut spektral çözünürlüğün artırılması hem de taranan dalga boyu aralığının genişletilmesinin fayda sağlayacağına inanılmaktadır. Ancak hiç şüphesiz ki bu durum, beraberinde cihaz maliyetinin de artmasına yol açacaktır.

Sonuç

Bu çalışmada düşük maliyetli ve küçük boyutlu bir spektral sensör ve kemometrik yöntemler kullanılarak, Antep fıstığında bezelye ve bezelye/ıspanak tağşişinin hızlı ve tahribatsız bir biçimde tespit edilme olanağı incelenmiştir. Bu amaçla saf Antep fıstığı ile bezelye ve/veya ıspanak karıştırılarak hazırlanan numunelerin reflektans spektrumları geliştirilen spektroskopik sensör kullanılarak 410-940 nm arasında elde edilmiştir. Çalışmada eğitilen derin öğrenme modeli eğitim, doğrulama ve test verileri için kabul edilebilir bir performans sergilemiştir. Ancak, özellikle %10 ve üzeri konsantrasyonlarda uygulanması olası tağşiş tespit etmede daha başarılı olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, mevcut sensör teknolojisi ve eğitilen modeli analitik hassasiyette tahminler üretmek için değil, rutin saha taramalarında ürün hakkında genel bir kanı elde etmek amacıyla kullanmanın faydalı olacağı kanısına ulaşılmıştır. Özetle, elde edilen verilerin ışığında; geliştirilen taşınabilir spektral sensörün Antep fıstığında tağşişin tespiti ve saf Antep fıstığı kullanımının doğrulanması için uygulanabilecek ekonomik, hızlı bir teknik olduğu ve farklı gıda ürünlerinin kalite tespiti uygulamalarında da kullanım potansiyeline sahip olduğu, ancak daha hassas tahminler elde etmek amacıyla hem spektral çözünürlüğün hem de taranan dalga boyu aralığının geliştirilebileceği ifade edilebilir.

Kaynaklar

Anagaw, Y. K., Ayenew, W., Limenh, L. W., Geremew, D. T., Worku, M. C., Tessema, T. A., Simegn, W. & Mitku, M. L. (2024). Food adulteration: Causes, risks, and detection techniques—review. *SAGE Open Medicine*, 12, 20503121241250184. <https://doi.org/10.1177/20503121241250184>.

- Aykas, D. P. & Menevseoglu, A. (2021). A rapid method to detect green pea and peanut adulteration in pistachio by using portable FT-MIR and FT-NIR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Control*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107670>.
- Bellon-Maurel, V., Fernandez-Ahumada, E., Palagos, B., Roger, J.-M. & McBratney, A. (2010). Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1073-1081. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.006>.
- Bro, R. & K. Smilde, A. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812-2831. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>.
- Campmajó, G., Navarro, G. J., Núñez, N., Puignou, L., Saurina, J. & Núñez, O. (2019). Non-targeted HPLC-UV fingerprinting as chemical descriptors for the classification and authentication of nuts by multivariate chemometric methods. *Sensors*, 19(6), 1388. <https://doi.org/10.3390/s19061388>.
- Campmajó, G., Saez-Vigo, R., Saurina, J. & Núñez, O. (2020). High-performance liquid chromatography with fluorescence detection fingerprinting combined with chemometrics for nut classification and the detection and quantitation of almond-based product adulterations. *Food Control*, 114, 107265. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107265>.
- Campmajó, G., Saurina, J. & Núñez, O. (2023). Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for nut classification and marker identification. *Food Control*, 152, 109834. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109834>.
- Cen, H. & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>.
- Çavuş, F., Us, M. F. & Güzelsoy, N. A. (2018). Assessing Pistachio Nut (*Pistacia vera* L.) Adulteration with Green Pea (*Pisum sativum* L.) by Untargeted Liquid Chromatography-(quadrupole-time of flight)-Mass Spectrometry Method and Chemometrics. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (19), 34-41.
- Çinarer, G., Doğan, N., Kılıç, K. & Doğan, C. (2024). Rapid detection of adulteration in pistachio based on deep learning methodologies and affordable system. *Multimedia Tools and Applications*, 83(5), 14797-14820. <https://doi.org/10.1007/s11042-023-16172-5>.
- De Maesschalck, R., Candolfi, A., Massart, D. L. & Heuerding, S. (1999). Decision criteria for soft independent modelling of class analogy applied to near infrared data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 47(1), 65-77. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00159-2](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00159-2).
- DHA (2021). *Baklavada "iç" hilesi! Ceviz yerine çekirdek, Antep fıstığı yerine...*, CNN TÜRK. <https://www.cnnturk.com/yasam/baklavada-ic-hilesi-ceviz-yerine-cekirdek-antep-fistigi-yerine>.
- Edwards, K., Manley, M., Hoffman, L. C. & Williams, P. J. (2021). Non-destructive spectroscopic and imaging techniques for the detection of processed meat fraud. *Foods*, 10(2), 448. <https://doi.org/10.3390/foods10020448>.
- Eksi-Kocak, H., Menten-Yilmaz, O. & Boyaci, I. H. (2016). Detection of green pea adulteration in pistachio nut granules by using Raman hyperspectral imaging. *European Food Research and Technology*, 242(2), 271-277. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2538-3>.
- FAO (2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Fox, G. & Cruickshank, A. (2005). Near infrared reflectance as a rapid and inexpensive surrogate measure for fatty acid composition and oil content of peanuts (*Arachis Hypogaea* L.). *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13(5), 287-291.
- Genis, H. E., Durna, S. & Boyaci, I. H. (2021). Determination of green pea and spinach adulteration in pistachio nuts using NIR spectroscopy. *LWT*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110008>.
- Ghosh, S., Domínguez, T. R. C., Diezma, B., Lleó, L., Barreiro, P., Lacarra, T. G. & Roger, J.-M. (2015). VIS/NIR spectral signature for the identification of peanut contamination of powder foods.
- Holbert, C. (2022). Outlier identification using mahalanobis distance. *Charles Holbert*. https://www.cfholbert.com/blog/outlier_mahalanobis_distance/.
- Ivosev, G., Burton, L. & Bonner, R. (2008). Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Analytical Chemistry*, 80(13), 4933-4944. <https://doi.org/10.1021/ac800110w>.
- Kalogiouri, N. P., Mitsikaris, P. D., Papadopoulos, A. N. & Samanidou, V. F. (2022). Microwave-assisted extraction coupled to HPLC-UV combined with chemometrics for the determination of bioactive compounds in pistachio nuts and the guarantee of quality and authenticity. *Molecules*, 27(4), 1435. <https://doi.org/10.3390/molecules27041435>.
- Kavdir, I., Lu, R., Ariana, D. & Ngouajio, M. (2007). Visible and near-infrared spectroscopy for nondestructive quality assessment of pickling cucumbers. *Postharvest Biology and Technology*, 44(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.002>.
- Kelly, J. D., Petisco, C. & Downey, G. (2006). Potential of near infrared transmittance spectroscopy to detect adulteration of irish honey by beet invert syrup and high fructose corn syrup. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14(2), 139-146.
- Kendirci, P. & Onoğur, T. A. (2011). Investigation of volatile compounds and characterization of flavor profiles of fresh pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *International Journal of Food Properties*, 14(2), 319-330. <https://doi.org/10.1080/10942910903177830>.
- Khan, S., Xiaobo, Z., Ilyas, M., Rahman, K. U., Khan, R. D., Shahid, K., Ahmad, A., Akbar, H., Ahmad, T., Irfan, M., Zafar, Z., Iqbal, A. Z., Boateng, R. A., Maqbool, B., Harlioglu, M. M. & Jamil, M. (2021). Fraud food and food spoilage detection by non-destructive technologies. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(7), 1389-1405.
- Lu, X., (2017). Sensing Techniques for Food Safety and Quality Control. *Royal Society of Chemistry*.
- Meulebroeck, W. & Thienpont, H. (2006). Optical detection techniques for laser sorting machines. *Optical Sensing II*. *Optical Sensing II*, 358-369.
- Modupalli, N., Naik, M., Sunil, C. K. & Natarajan, V. (2021). Emerging non-destructive methods for quality and safety monitoring of spices. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.021>.
- Mohammadi-Moghaddam, T., Razavi, S. M. A., Sazgarnia, A. & Taghizadeh, M. (2018). Predicting the moisture content and textural characteristics of roasted pistachio kernels using Vis/NIR reflectance spectroscopy and PLSR analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 346-355. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9646-7>.
- Nobari Moghaddam, H., Tamiji, Z., Akbari Lakeh, M., Khoshayand, M. R. & Haji Mahmoodi, M. (2022). Multivariate analysis of food fraud: A review of NIR based instruments in tandem with chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104343. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104343>.
- Sezer, B., Apaydin, H., Bilge, G. & Boyaci, I. H. (2019). Detection of *Pistacia vera* adulteration by using laser induced breakdown spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2236-2242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9418>.
- Shenk, J. S. & Westerhaus, M. O. (1993). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*.

- SU (2020). *Gıda sahtekarları açıklandı! Dana diye domuz, Antep fıstığı diye yer fıstığı satmışlar.* <https://www.sozcu.com.tr/canonicalUrl>.
- Suman, M., Cavanna, D., Sammarco, G., Lambertini, F. & Loffi, C. (2021). Fighting food frauds exploiting chromatography-mass spectrometry technologies: Scenario comparison between solutions in scientific literature and real approaches in place in industrial facilities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 142, 116305. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116305>.
- Sundaram, J., Kandala, C. V. & Butts, C. L. (2009). Application of near infrared spectroscopy to peanut grading and quality analysis: overview. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3(3), 156-164. <https://doi.org/10.1007/s11694-009-9081-5>.
- Taskesen, E. (2023). What are PCA loadings and how to effectively use Biplots?. *Towards Data Science*. <https://towardsdatascience.com/what-are-pca-loadings-and-biplots-9a7897f2e559>.
- Teixeira, A. M. & Sousa, C. (2019). A review on the application of vibrational spectroscopy to the chemistry of nuts. *Food Chemistry*, 277, 713-724. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.030>.
- Temizkan, R., Dogan, M. A., Atakan, O., Nazım, B. A. & Ayvaz, H. (2020). Rapid detection of green pea adulteration in ground pistachio nuts using near and mid-infrared spectroscopy.
- TOB (2019). Kamuoyu duyurusu, Tarım ve Orman Bakanlığı. https://www.dunya.com/storage/old/uploads/content/kamuyu-uyurusu-tarim11pdf_NgT9T.pdf.
- Turgut, S. S., Bilge, G., Entrenas, J. A. & Pérez-Marín, D. (2024). Significant roles of smart sensors in the modern agriculture and food industry, In A. Hassoun, (Eds.), *Food Industry 4.0* (pp. 133-170). <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15516-1.00008-6>.
- Vega-Castellote, M., Sánchez, M.-T., Torres-Rodríguez, I., Entrenas, J.-A. & Pérez-Marín, D. (2024). NIR sensing technologies for the detection of fraud in nuts and nut products: A review, *Foods*, 13(11), 1612. <https://doi.org/10.3390/foods13111612>.
- Walach, J., Filzmoser, P. & Hron, K. (2018). Data normalization and scaling: Consequences for the analysis in omics sciences, *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 165-196). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.06.004>.
- Williams, P. (2001). Implementation of near-infrared technology. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543025338730368>.
- Williams, P. C. & Sobering, D. C. (1993). Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 1(1), 25-32. <https://doi.org/10.1255/jnirs.3>.
- Yuille, A. (2014). Lecture 10. PCA, SVD and Fisher Linear Discriminant.
- Zannella, C., Carucci, F., Aversano, R., Prohaska, T., Vingiani, S., Carputo, D. & Adamo, P. (2017). Genetic and geochemical signatures to prevent frauds and counterfeit of high-quality asparagus and pistachio. *Food Chemistry*, 237, 545-552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.158>.



The Concept of Edible Insect and its Use in Bakery Products: Investigation of Sensory Quality of Cookies Containing Edible Locust (*Locusta migratoria*)

Servet Kazım Güney^{1,a,*}, İrem Bedir^{1,b}, Emre Sarıal^{1,c}

¹Başkent Üniversitesi Güzel Sanatlar Tasarım ve Mimarlık Fakültesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü. 06790, Ankara, Türkiye.

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 07.05.2024 Accepted : 20.08.2024</p> <p>Keywords: Edible Insects Entomophagy Neophobia <i>Locusta migratoria</i> Sensory Evaluation</p>	<p>The aim of this study is to produce a bakery product with increased protein content using grasshoppers, thus changing the view on the consumption of edible insects, an important food source, and raising awareness about entomophagy. The main goal is to provide a more sustainable consumption product to the world's diminishing resources. Migratory locust (<i>locusta migratoria</i>) was used in the study. A control sample and salted cookies containing 1% and 2% locust powder were produced. The products were sensory evaluated by a group of 10 trained panelists. The product with the highest overall score was then presented to the consumer taste of 81 people. In the evaluations, a 5-point Likert scale was used for appearance, color, taste, smell, texture, mouthfeel and overall acceptance. According to the data obtained after the sensory evaluation applied to trained panelists, grasshopper salt cookies prepared with 1% grasshopper powder was the most liked product with a score of 4.7/5. According to the results of the consumer liking test, in which 81 people participated, a general liking score of 4.56/5 was reached. 70% in the trained panellist group and 85% in the consumer taste test answered 'I would buy'. In addition, protein analysis of the products was carried out by Protein Kjeldahl method (AOAC 960.52. Foss Tecator Manuel 2300 AB 2003 AN, All foods) in Tübitak MAM laboratories. According to the results of the analysis; the protein ratio of the control sample was 11.4g/100g and the protein ratio of the sample to which grasshopper was added at 1% of the dough weight was 11.69g/100g.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2216-2221, 2024

Yenilebilir Böcek Kavramı ve Unlu Mamulde Kullanımı: Yenilebilir Çekirge (*Locusta Migratoria*) İçeren Kurabiyelerin Duyusal Kalitesinin İncelenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 07.05.2024 Kabul : 20.08.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Yenilebilir Böcekler Entomofaji Neofobi Çekirge Duyusal Değerlendirme</p>	<p>Bu çalışmanın amacı, çekirge kullanarak protein oranı artırılmış bir unlu mamul üretmek, bu sayede önemli bir gıda kaynağı olan yenilebilir böceklerin tüketilmesine olan bakışı değiştirebilmek ve entomofaji konusunda farkındalık oluşturmaktır. Dünya'nın azalan kaynaklarına daha sürdürülebilir bir tüketim ürünü kazandırmak esas amaçtır. Çalışmada göçmen çekirge (<i>locusta migratoria</i>) kullanılmıştır. Bir kontrol örneği ile %1 ve %2 oranlarında çekirge tozu içeren tuzlu kurabiye üretilmiştir. Ürünlerin 10 kişilik eğitimli panelist grubu tarafından duyusal değerlendirilmesi yapılmıştır. Genel beğeni puanı en yüksek olan ürün, sonrasında 81 kişinin tüketici beğenisine sunulmuştur. Değerlendirmelerde, görünüş, renk, tat, koku, tekstür, ağızda bıraktığı his ve genel görünüm kriterleri üzerinden 5'li Likert ölçeği kullanılmıştır. Eğitimli panelistlere uygulanan duyusal değerlendirme sonrasında elde edilen verilere göre %1 oranında çekirge tozu ile hazırlanan çekirgeli tuzlu kurabiye 4,7/5 puan ile en çok beğenilen ürün olmuştur. 81 kişinin katıldığı tüketici beğenisi testi sonuçlarına göre 4,6/5 genel beğeni puanına ulaşılmıştır. Eğitimli panelist grubunda %70 ve tüketici beğeni testinde %85 oranında ürünü "satın alırım" cevabı verilmiştir. Ek olarak, Tübitak MAM laboratuvarlarında Protein Kjeldahl yöntemi (AOAC 960.52. Foss Tecator Manuel 2300 AB 2003 AN, Tüm gıdalar) ile ürünlerin protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre; kontrol numunesinin protein oranı 11.4g/100g, hamur ağırlığının %1'i kadar çekirge eklenen numunenin protein oranı ise 11.69g/100g olarak tespit edilmiştir.</p>

^a servetkg@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-1948-4223>

^c irembedir@gmail.com

^d <https://orcid.org/0009-0009-8212-1474>

^e emresarial.1996@gmail.com

^f <https://orcid.org/0009-0003-1442-9465>



Giriş

İnsanlar tükettikleri besinlerin üretildiği koşulları bilmek isterler (Cankül ve ark., 2023) Sürdürülebilir gastronomi ise tam olarak bu amaca hizmet etmektedir. Sürdürülebilir gastronomi, kırsal kalkınmaya faydalı, var olan düzenden daha adil, tarım ve ekonomide de sürdürülebilir olmayı hedeflemektedir (Lopes, 2019).

Tarih boyunca coğrafya, savaş, ticaret, siyaset ve din gibi birçok etmen tarafından etki altında kalan kültürlerin birbirlerinden farklı tüketim alışkanlıkları vardır. Bununla birlikte bir kültürün içinde de farklılıklar oluşabilir. Bazı bilim insanlarına göre, neofobi (yeni lezzetler denemekten korkma) nedeniyle bireylerin böcek tüketmeye karşı olumsuz bir bakış açısı bulunmaktadır. Protein değeri yüksek bu besin kaynağının tüketimini artırmaya yönelik çalışmalar özellikle sürdürülebilirlik açısından önemlidir (Kim ve ark., 2019). Bu çalışmada, metan gazı üretimi nedeniyle iklim üzerinde etkileri tartışılan kasaplık hayvanlardan farklı olarak; sera gazı oluşumu yönünden çevreye zararı olmayan, daha sürdürülebilir ve protein açısından zengin bu kaynağın farklı alanlarda da kullanılabilmesi gösterilmek istenmektedir. Bütün bu açılardan değerlendirildiğinde, bu çalışmanın literatüre önemli bir katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir.

Gıda Neofobisi

Gıda neofobisi, değişik ve yeni besinleri denemeye, bu gıdaları yerken çekince yaşama olarak tarif edilmektedir ve bir bakıma insanın kendisini korumak için kullandığı savunma kalkanıdır. Bazı bilim insanları neofobinin *Omnivore's Dilemma* (hepçil ikilemi) kökenli olduğundan bahsetmektedir. Bu bakış açısına göre; bu ikilemin temelinde, etrafımızda birçok yemek kaynağı olmasına rağmen yeni gıda arayışının güvenli olmadığı, çünkü bilmediğimiz gıdalardan zehirlenebileceğimiz düşüncesi yatmaktadır. Bu nedenle, gıda neofobisi, olası besinlerden en fazla faydayı sağlayabilme yolları aramamızı sağlamaktadır. Bazı araştırmacılar gıda neofobisinin insanın yemekten korktuğu besine fazlaca maruz bırakılarak kontrol altına alınabileceğini belirtmektedir (Akar Şahingöz & Ceylan, 2019; Pollan, 2007).

Bazı bilim insanlarına göre, bu korku insanoğluna özgüdür. Neofobinin özellikle küçük bireylerle gözlemlenen seçici-telaşlı besin tüketiminin alt dallarına ait olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, küçük bireylerin önceden denemediği yiyeceklerden doğal olarak kaçma mekanizmasına sebep olduğu bilinmektedir. Kişideki korku seviyesinin 2 yaşından 6 yaşına kadar en yüksek seviyesine ulaştığı gözlemlenmektedir. Bu dönemlerden sonra düşmeye başladığı, insanların büyüdükçe besin deneyimlerinin fazlaştığı ve bu sebeple neofobi seviyesinin yaşlandıkça en az seviyeye geldiği bildirilmektedir (Akar Şahingöz & Ceylan, 2019). Yeme tercihlerinin edinildiği 1 ve 2 yaş periyodu, küçük bireylerdeki neofobi seviyesi bakımından önemli bir süreçtir. Bu yaşlar çocukların süt yerine değişik besinlerle tanışma ve benimseme evresi olduğu için, araştırmalarda 1-2 yaş aralığına daha fazla önem verilmesini sağlamıştır (Nicklaus, 2011: 812). Erken yaşlarda tanışılmamış koku ve tatların ileriki dönemlerde çocuğun besini talep etmesinde ya da çekimser olmasında çok önemli olduğu değerlendirilmektedir (Akar Şahingöz & Ceylan, 2019).

Neofobi, yeme rutinleriyle organik bir şekilde ilişkilidir ve bu durum da geçtiğimiz yirmi yıllık periyotta çeşitli araştırmaların ana konusu olmasını sağlamıştır. Neofobinin çocuklarda daha çok sebze ve meyve kaynaklı olduğu gözlemlenmektedir. Dört ve 5 yaşlarındaki çocukların öğle yemekleri üzerinde gıda neofobisi ile ilgili yürütülen bir çalışmada çocuklara birbirinden farklı besinler verilmiş; neofobiyi en fazla kanatlı hayvanların, en az ise çikolatanın tetiklediği gözlemlenmiştir (Akar Şahingöz & Ceylan, 2019).

Mankan (2017) çalışmasında Türkiye'de böcek yenmesinin böcek hakkındaki algı, dini tutumlar ve neofobi sebebiyle yeme eğilimi kazanamayacağını anlatmış, böcek tüketimi ile neofobi arasındaki ilişkiyi gün yüzüne çıkarmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda neofobinin kişilik özelliklerinin yanında cinsiyet, yaş gibi etmenlere olan etkileşime ve daha önceki deneyimlere göre şekil aldığı anlaşılmaktadır.

Bir başka araştırmanın sonuçlarına göre, kişideki neofobinin anne sütünün bırakıldığı evrede ortaya çıktığı ve seviyenin en çok bu yaş periyodunda başladığı belirtilmektedir. Bir başka bakış açısına göre ise, gıda neofobisi seviyesi erişkinlik evresinde de devamlılığını sürdürmektedir (Henriques ve ark., 2009: 83).

Entomofaji

Entomofaji Nedir?

Entomofaji, böcek anlamına gelen *entomo* ve yemek anlamına gelen *phagein* kelimelerinden türetilmiştir ve böceklerin yiyecek olarak tüketilmesi olarak tanımlanmaktadır (Egeli, ve ark., 2022). Dünya Sağlık Örgütü (FAO), artan nüfusa alternatif besin kaynakları bulmak için yenilebilir böcek içeren diyetleri önermektedir (Ramos-Elorduy, 1998; Gahukar, 2011; Belluco ve ark., 2013). Böcekler organik atıkları tüketebilmekle birlikte, birçok hayvandan daha düşük sera gazı salınımı yapmaktadırlar. Bununla birlikte, böcekler besi hayvanı üretimi sürecinde doğal alanlara, suya ve çevreye verilen zararları azaltmak için yem olarak da kullanılabilir (Yılmaz & Yalçın, 2022). Dünya'da bilinen 2037 çeşit böcek türü Dünya'nın farklı ülkelerinde tüketilmekte ve 2 milyarı aşan sayıdaki insan için vazgeçilmez bir besin kaynağı olmaktadır (Bessa ve ark., 2020). 2014 yılında Hollanda'da un böceği burgerleri pazara sürülmüş ve Hollanda'yı 2015'te Belçika ve 2017'de İsviçre takip etmiştir (Bessa ve ark., 2020). Dünyadaki böcek türlerinin kalori değeri buğdaydan %95, mısırdan %87, balıktan %70, sığır etinden %63 ve soya fasulyesinden %50 daha fazladır (Ramos, 1997; Özkan, 2019). Böcekler mevcut besin kaynaklarına (tavuk, balık, kırmızı et) alternatif olarak görülmektedir (Ramos-Elorduy, 1998). Böcekler diğer protein kaynaklarına göre daha yüksek protein oranına ve daha az yağ içeriğine sahiptir (Ramos-Elorduy, 1998; Anankware ve ark., 2015; Muslu, 2020; Yazıcı & Ozer, 2021). Böcek tozlarının protein içeriği, böcek türüne ve kullanılan ön işleme yöntemine bağlı olarak %30-67 arasında değişebilmektedir (Amoah ve ark. 2023). Böcek tüketimi, Güney Amerika, Meksika, Asya ve Afrika'daki etnik gruplarda yaygındır ve bu ülkelerde böcek ununun ham ve işlenmiş hali kullanılarak besinlerin protein

değerini artırmada kullanılmaktadır (Gahukar, 2011; La Barbera ve ark., 2020). Amerika'da 20 gıda şirketi tarafından 2012-2015 yıllarında yenilebilir böcek ürünleri üretilmiştir. 2014'te 60 milyon civarında çekirgeden 3.750.000 protein barı üretilip satışa sunulmuştur (Hoffman, 2014; Ryu ve ark., 2017).

Özetle, unlu mamullerde böcek tozlarının kullanılması, yalnızca rafine buğday unundan yapılan geleneksel unlu mamul formülasyonlarına kıyasla protein, yağ, lif, vitamin ve mineral içeriğini önemli ölçüde artırabilir. Bu da böceklerle zenginleştirilmiş unlu mamulleri tüketiciler için daha besleyici bir seçenek haline getirmektedir (Amoah ve ark., 2023; Yazici & Ozer, 2021).

Yenilebilir böcek kullanarak fırıncılık ürünleri geliştirilmesindeki en büyük zorluk tüketicilerin bu mamullerin tadı, aroması, rengi ve dokusu konusunda çekinceleri olmasıdır. Duyusal çekiciliği artırmaya yönelik stratejiler arasında böcekleri daha az görünür kılmak için unla karıştırılmış böcek tozu kullanmanın yanı sıra böcek yetiştirme, işleme ve kurutma yöntemlerini optimize etmek de yer almaktadır. Özellikle kurutma yöntemi uçucu bileşikleri ve kokuyu etkileyebilir (Yazici & Ozer, 2021).

Çekirge

Acrididae: Kırlarda gezinirken gördüğümüz çekirgelerin çoğu bu aileden gelmektedir. Yaşam alanları step benzeri kırlar ve çayırlardır. Çok kurak ve çok nemli yerlerde yaşayan türleri de bulunmaktadır. En az ormanlarda bulunurlar. Boyları 1 ila 10 cm arasında olup antenleri vücudunun boyundan kısadır, fakat ön kalçadan uzundur. Çoğunun kanatları gelişmiştir. Arka femurun üst kanada sürtünmesi ile ses çıkarırlar. İştme organı çoğunda bulunur ve birinci abdomen segmentinin yanında timpanum denen zarla dış ortamdan ayrılır. Bacaklarının yanında 3 segmentli Tarsus vardır. Çayırımsı bitkilerle beslenirler. Zaman zaman fazla çoğalarak felakete sebebiyet verebilmektedirler. Göçücü çekirgeler en yaygın türdür. Birçok alttürü ile Eski dünyanın değişik bölgelerinde temsil edilirler. Caelifera (kısa antenli çekirgeler) alttakımının acrididae familyasından gelmektedirler. Göç eden bir çekirge türüdür. Kısa iplik gibi antenleri vardır ve üst kanatlarının sürtünmesiyle ses çıkarmazlar (Demirsoy, 2014; FAO, 2024)

Locusta Migratoria bazı kaynaklarda Madrap çekirgesi olarak da geçmektedir. Bu cins çekirgelerin kanatları gelişmiştir ve üst kanatlarında kahverengi lekeler mevcuttur. Çekirgeler yumurtalarını grup şeklinde ya da tek tek yüksük içerisine bırakırlar. Locusta Migratoria cinsi için yüksük uzunluğu 45-67 mm arasındadır. Bu cins çekirgeleri dişisi 37-62 mm; erkeği 28-44 mm'dir (TC. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2008).

Yenilebilir böceklerin fırıncılık ürünlerinde kullanımı kapsamında incelendiği bir çalışmada, ekmeğin yenilebilir böcek tozlarıyla zenginleştirilmiş en yaygın unlu mamul olduğu; onu kekler, bisküviler, krakerler ve kurabiyelerin takip ettiği belirtilmektedir. En yaygın olarak kullanılan yenilebilir böceklerin başında cırcır böceği (*Acheta domesticus*) ve un kurdu (*Tenebrio molitor*) gelmekle birlikte; kullanılan diğer böcekler arasında palmye biti larvaları, çekirgeler ve Afrika imparator güvesi tırtılları yer almaktadır. Yenilebilir böceklerin insan tüketimine uygun hale getirilmesinde kullanılan en yaygın ön işlem yöntemleri arasında dondurarak kurutma, fırında/tepside

kurutma, mikrodalga kurutma, haşlama ve kavurma yer almaktadır. Dondurarak kurutma, diğer yöntemlere kıyasla yapısal bütünlüğün daha iyi korunmasını ve besin değeri kaybının en az seviyede olmasını sağlamaktadır. %10'a kadar böcek tozu içeren ekmekekler ve %5'e kadar böcek tozu içeren muffin/bisküvi/kraker/kurabiyeler tüketiciler tarafından genellikle kabul edilebilir bulunmuştur. Böcek zenginleştirilmesi unlu mamullerin protein, yağ ve lif içeriğini artırmış, ancak aynı zamanda kontrol örneklerine kıyasla özgül hacmi, hafifliği azaltma ve sertliği artırma eğiliminde olmuştur (Amoah ve ark. 2023). Yenilebilir böceklerin farklı mamuller içinde kullanılmasının tüketici tarafından kabul edilebilirliğine yönelik olarak yapılan araştırmalarda; örneğin Polonya'da, Polonyalı öğrenciler yenilebilir böceklerin tamamını tüketme konusunda düşük isteklilik gösterirken, yenilebilir böceklerle zenginleştirilmiş unlu mamulleri, özellikle de ekmekek ve bisküvileri daha fazla beğendiklerini belirtmişlerdir (Orkusz ve ark., 2020). Avustralya'da tüketiciler, yenilebilir böceklerle zenginleştirilmiş bir bisküviyi tüketebileceklerini, ancak ürünün iyi gıda güvenliği, kalite ve besin değerleriyle birlikte çekici bir görünüme ve tada sahip olması gerektiğini belirtmiştir (Wilkinson ve ark., 2018). İrlanda'da tüketiciler, protein bar kategorisinde en çok satan ürünlerle rekabet edebilecek şekilde fiyatlandırılan ve cazip bir tada sahip protein barlarda kullanıldığında yenilebilir böcek tüketimini tercih ettiklerini bildirmiştir (Herbert ve Beacom, 2021). Bu bulgular, tanıdık unlu mamullere dâhil edildiğinde yenilebilir böcekleri tüketmeye istekli olduğunu vurgulamaktadır.

Yöntem

Kurabiye Hazırlanması

Literatürde araştırmanın konusunu oluşturan çekirgeli tuzlu kurabiye üretimine rastlanılmamıştır. Ürünün reçetesi klasik tuzlu kurabiyeye çekirge tozu eklenerek oluşturulmuştur. Kullanılan temel reçete Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Temel Tuzlu Kurabiye Hamuru

Table 1. Basic Salted Cookie Dough

Malzemeler	Miktar
Un	1 kg
Yumurta	200 g
Margarin	600 g
Tuz	25 g
Şeker	50 g

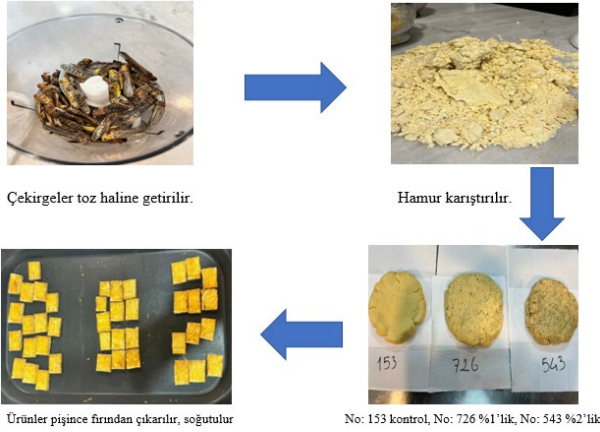
(Güney, 2015, s.182)

Reçetenin hazırlanmasında kullanılan göçmen çekirge (*Locusta migratoria*), Antalya bölgesinde üretim yapan yerel bir firmadan kurutulmuş olarak satın alınmıştır. Ürünler kontrol (153 nolu örnek), %1 (726 nolu örnek) ve %2 (543 nolu örnek) çekirge tozu katkılı olarak hazırlanmıştır.

Reçetenin Hazırlanışı

Temel kurabiye hamuru kısa süre yoğurularak hazırlandıktan sonra tartılır ve 3 eşit parçaya ayrılır. Çekirgeler mutfak robotunda toz haline getirilir. Hamurun bir parçası kontrol örneği olarak ayrılır. Diğer parçalardan

birine toplam ağırlığının %1'i, diğerine de %2'si kadar çekirge tozu katılır. Hamur tekrar yoğrulur. Hazırlanan hamur üzeri örtülerek 30 dakika dinlenmeye bırakılır. Dinlenen hamurlar merdane yardımıyla 5 mm kalınlığında açıldıktan sonra her biri 10 g ağırlığında olacak şekilde kesilir. Kurabiyeler tepsilere dizilir ve üzerlerine yumurta sarısı sürülür. Önceden 160 derecede ısıtılmış fırında 14-16 dakika arasında pişirilir. Pişirme süresi fırının kalibrasyonu ve rakıma göre değişiklik gösterebilir.



Şekil 1. Kurabiye reçetesinin hazırlanma aşamaları
Figure 1. Stages of preparing the cookie recipe

Duyusal Değerlendirme

Duyusal değerlendirme panellerinde; eğitimli 3-10, yarı eğitimli 8-25, eğitimsiz en az 80 panelistin olması gerektiği belirtilmektedir (Altuğ Onoğur ve Elmacı, 2015, s. 31). Çalışmanın duyusal değerlendirmesi Başkent Üniversitesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 10 eğitimli paneliste kalite derecelendirme testi uygulanmıştır. Ürünler kontrol (153 nolu örnek), %1 (726 nolu örnek) ve %2 (543 nolu örnek) çekirge tozu katkılı olarak hazırlanmıştır. Bir sonraki aşamada, eğitimli panelistlerin değerlendirmelerinden elde edilen sonuçlara göre daha fazla beğenildiği tespit edilen %1 çekirge tozu katkılı (726 nolu örnek) ürün 81 kişinin tüketici beğenisine sunulmuştur. Panelistlerin kalite derecelendirme testini doldurmaları sağlanmış ve sonuçları kaydedilmiştir. Panelistlere hedonik beğeni testi uygulanmıştır. Beğeni testinde; 1 (Çok kötü), 2 (Kötü), 3 (Orta), 4 (İyi) ve 5 (Çok iyi) olmak üzere 5'li likert ölçeği kullanılmıştır. Çekirgeli kurabiyenin; dış görünüş (çatlaksız, standart tuzlu kurabiye), tekstür (ısırınca hemen kırılmalı ve ağızda

kolayca dağılmalı), renk (kahverengi tonlarında olmalı), koku (tuzlu kurabiye kokusu), tat (tuzlu kurabiye tadı), ağızda bıraktığı his ve genel izlenim kriterleriyle değerlendirilmesi istenmiştir. Testin sonunda katılımcıların ürünü satın alma isteklerini belirtmeleri de istenmiştir.

Protein Analizi

Tübitak MAM laboratuvarlarında Protein Kjeldahl yöntemi (AOAC 960.52. Foss Tecator Manuel 2300 AB 2003 AN, Tüm gıdalar) ile ürünlerin protein analizleri yapılmıştır. Bu çalışma Başkent Üniversitesi Sosyal ve Beşeri Bilimler ve Sanat Alan Araştırma Kurulu'nun 22.04.2024 tarihli, 17122698.600-116 sayılı etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir.

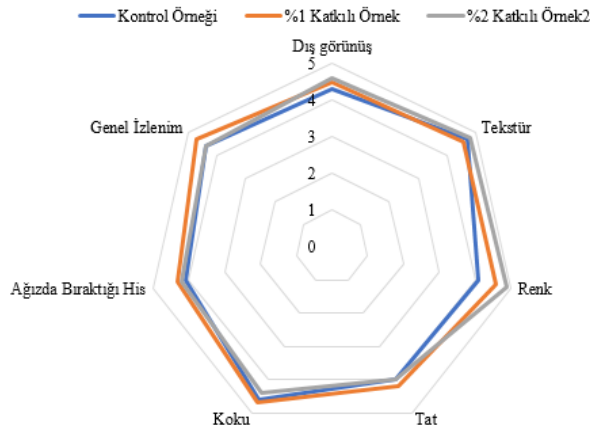
Bulgular

Üretilen ürünlerin tüketicilerce kabul görmesi, tercih edilmesi ve beğenilmesi gıda üreticileri için önemlidir. Lezzet henüz enstrümental yöntemlerle ölçülememektedir. Lezzeti ölçmek için insan duyuları kullanılmaktadır. Bu nedenle, duyusal değerlendirme basit bir tadımın ötesinde, bir ölçme aracıdır (Gönül, 1983). Tübitak MAM laboratuvarlarında Kjeldahl yöntemi ile ürünlerin protein analiz sonuçlarına göre; kontrol numunesinin protein oranı 11.4g/100g, hamur ağırlığının %1'i kadar çekirge eklenen numunenin protein oranı ise 11.69g/100g olarak tespit edilmiştir. Eğitimli panelist grubu ile gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen bulgulara göre; %1 oranında çekirge tozu içeren örnek genel beğeni 4,7/5 ve koku 4,7/5 ortalamalarıyla diğer örneklerden daha fazla beğenildiği tespit edilmiştir. Katılımcılardan yedisi ürünü satın alma isteği sorusuna evet yanıtını vermişlerdir. %2'lik çekirge içeren kurabiyeden et tadı hissedildiği tadım formunda belirtilmiştir. Çekirgeli kurabiyeye çikolata eklenerek de bir ürün geliştirme yapılabileceği yorumu alınmıştır. Deneyimli panelist grubu tarafından en çok beğenilen %1 çekirge içeren örnek kullanılarak 81 kişi ile gerçekleştirilen tüketici beğeni testi sonuçlarına göre, tat 4,6/5 ve genel beğeni 4,6/5 ile yüksek beğeni puanları elde edilmiştir. Panelistlerin hepsi ilk kez bu duyusal değerlendirme yoluyla çekirge tüketmiştir. Tüketici beğeni testine katılan kişilerden olumsuz yanıt alınmadığı ve katılımcıların tamamına yakınının değerlendirmelerin sonunda kurabiyeden bir tane daha isteyip tükettikleri gözlemlenmiştir. Bu gözlem bize grubun yeni ürünler denemekten korkmadıklarını, aksine buna açık olduklarını göstermektedir. Bulgulara ait detaylar Tablo 2'de ve Şekil 2 ve 3'te verilmiştir.

Tablo 2. Duyusal Analiz Sonucuna Göre Panelistlerin Kurabiye Örneklerine Ait Puanlamaları

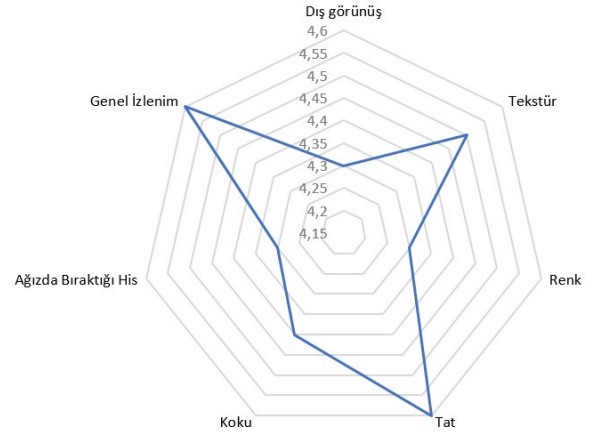
Table 2. Panelists' Ratings of The Cookie Samples According to the Sensory Analysis Results

Özellikler	153 (Kontrol)	726 (%1 katkılı)	543 (%2 katkılı)
Dış görünüş	4,3±1,05	4,5±0,70	4,6± 0,51
Tekstür	4,7±0,67	4,6± 0,51	4,8± 0,42
Renk	4,1±1,10	4,6± 0,69	4,9± 0,31
Tat	4,0±1,05	4,2± 0,63	4,0± 0,66
Koku	4,6±0,69	4,7± 0,48	4,4± 0,69
Ağızda Bıraktığı His	4,1±0,87	4,3± 0,67	4,2± 0,78
Genel İzlenim	4,4±0,69	4,7± 0,48	4,4± 0,69



Şekil 2. Kurabiye Örneklerinin Duyusal Değerlendirmesine Ait Radar Grafiği

Figure 2. Radar Graph for Sensory Evaluation of Cookie Samples



Şekil 3. Tüketici Beğeni Testi Sonuçlarına Ait Radar Grafiği

Figure 3. Radar Graph for Results of Consumer Liking Test

Tablo 3. Tüketici Beğeni Testi Ortalama Grafiği

Table 3. Mean Graph of Consumer Liking Test

Özellikler	Ortalama±Std. sapma
Dış görünüş	4,3±0,65
Tekstür	4,5±0,61
Renk	4,3±0,79
Tat	4,6±0,64
Koku	4,4±0,68
Ağızda Bıraktığı His	4,3±0,85
Genel İzlenim	4,6±0,56

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmanın amacı, çekirge kullanarak unlu mamul üretmek, bu sayede önemli bir gıda kaynağı olan yenilebilir böceklerin tüketilmesine olan bakışı değiştirebilmek ve *entomofaji* konusunda farkındalık oluşturmaktır. Literatür taramasında, araştırmanın konusu olan yenilebilir böceklerle unlu mamul üretilmesi ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu araştırma, %1 oranında çekirge içeren ürünün 4.7/5 gibi çok yüksek bir ortalama ile beğenildiğini göstermiştir. Tüketici beğeni testi ile 81 kişinin değerlendirmesine sunulan bu ürün 4.6/5 gibi yüksek bir beğeni puanı almıştır. Ek olarak, Tübitak MAM laboratuvarlarında Protein Kjeldahl yöntemi (AOAC 960.52. Foss Tecator Manuel 2300 AB 2003 AN, Tüm gıdalar) ile ürünlerin protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre; kontrol numunesinin protein oranı 11.4g/100g, hamur ağırlığının %1'i kadar çekirge eklenen numunenin protein oranı ise 11.69g/100g olarak tespit edilmiştir. Tüketici beğeni testi sonuçlarına göre genel eğilim %85 oranında "satın alırım" yönünde olmuştur.

Tüketici beğeni testine katılan kişilerin bu ürünü tatmak konusunda hiçbir çekince göstermedikleri ve buna ek olarak çoğunluğun da değerlendirmelerin sonunda kurabiyeden bir tane daha isteyip tüketmek konusunda istekli oldukları gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, doğru metotlar izlenerek entomofaji ve neofobi konusunda olumlu ilerleme kaydedilebileceği düşünülmektedir. Çekirge gibi alternatif gıdaların farklı yiyeceklerle karıştırılarak kullanılabilirliği ve bu konuda genişleyen bir pazara hitap edilebileceği

değerlendirilmektedir. Bu sayede yenilebilir böcekler ülkemizde ve dünyada daha da büyüyerek kendisine bir pazar oluşturabilir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, kullanılacak çekirge miktarının artırılarak protein oranındaki değişikliğin analiz edilmesinin bu açıdan olumlu sonuçlar vereceği değerlendirilmektedir. Yenilebilir böceklerin insan tüketimine uygun hale getirilmesi aşamalarında kullanılan yöntemlerinin, böcek tozlarının besin değeri üzerindeki etkilerini karşılaştıran çalışmalar yapılabilir. Karbon ayak izi, su ayak izi ve zenginleştirilen ürünlerin raf ömrü konularında yeni araştırmalar teşvik edilebilir. Çekirgenin veya yenilebilir böceklerin çikolata, granola, kahvaltılık gevrekler gibi ürünlere eklenerek duysal ve besin analizlerinin yapılmasının sürdürülebilirlik, neofobi ve gıda kaynaklarının çeşitlendirilmesi alanlarında literatüre ve sektöre önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Akar Şahingöz, S., Ceylan, V. (2019). Yetişkin Bireylerde Gıda Neofobi Düzeyinin Belirlenmesi. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 7(2): 772-784 <https://doi.org/10.21325/jotags.2019.391>
- Altuğ Onoğur, T. & Elmacı, Y. (2011). Gıdalarda Duyusal Değerlendirme, (2. Baskı). İzmir, Sidas Yayıncılık.
- Amoah, I., Cobbinah, J. C., Yeboah, J. A., Essiam, F. A., Lim, J. J., Tandoh, M. A., & Rush, E. (2023). Edible Insect Powder For Enrichment of Bakery Products—A Review of Nutritional, Physical Characteristics and Acceptability of Bakery Products to Consumers. *Future Foods*, 100251. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100251>

- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G. and Ricci, A. (2013). Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 296-313. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12014>
- Bessa, L. W., Pieterse, E., Sigge, G. and Hoffman, L. C. (2020). Insects as human food; from farm to fork. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 100(14), 5017–5022. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8860>
- Cankül, D., Çınar, K., Kızıldaş, M. Ç., Cankül, I. (2023). An Investigation of The Key Determinants of Intention to Use Payment With Cryptocurrency: The Case of Restaurant Businesses. *Gastroia: Journal of Gastronomy And Travel Research*, 7(2), 461-479. <https://doi.org/10.32958/gastoria.1297334>
- Demirsoy, A. (2014). Yaşamın Temel Kuralları; Omurgasızlar, Böcekler, Entomoloji. (1. Basım). Ankara: Hacettepe Üniversitesi
- Egeli, S., Kızıldemir, Ö. & Hülaga-Kaderoğlu, G. (2022). Sürdürülebilir Gastronomi Turizmi Kapsamında Yenilebilir Böcekler (Edible Insects within the Scope of Sustainable Gastronomy Tourism). *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*. 10 (3): 2638-2664. <https://doi.org/10.21325/jotags.2022.1109>
- FAO. (2024). Asian Migratory Locust, Erişim Tarihi: 16.04.2024. Retrieved from <https://www.fao.org/locusts-cca/bioecology/asian-migratory-locust-lmi/es/>
- Gahukar, R. T. (2011). Entomophagy and Human Food Security. *International Journal of Tropical Insect Science*. 31(3), 129-144. <https://doi.org/10.1017/S1742758411000257>
- Gönül, M., (İzmir,1983) Duyusal Değerlendirmede Sonuca Güveni Etkileyen Faktörler. GIDA Yıl:8 Sayı:6 Kasım - Aralık
- Groves, A. M. (2001). Authentic British food products: A review of consumer perceptions. *International Journal of Consumer Studies*, 25(3): 246-254.
- Güney, S. K. (2015). Yemeğin Sırrı. Ankara: Detay Yayıncılık
- Henriques, A. S., King, S. C., Meiselman, H. L. (2009). Consumer Segmentation Based on Food Neophobia and Its Application to Product Development. *Food Quality and Preference*. 20: 83-91.
- Herbert, M., Beacom, E., (2021). Exploring Consumer Acceptance of Insect-Based Snack Products in Ireland. *J. Food Products Market*. 27 (6), 267–290. <https://doi.org/10.1080/10454446.2021.1994080>.
- Hoffman, A. (2014). Inside the Edible Insect Industrial Complex. Available from <https://www.fastcompany.com/3037716/insidethe-edible-insect-industrial-complex>
- Kim, T. K., Yong, H. I., Kim, Y. B., Kim, H. W., & Choi, Y. S. (2019). Edible Insects as a Protein Source: A Review of Public Perception, Processing Technology, and Research Trends. *Food science of animal resources*, 39(4), 521–540. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e53>
- La Barbera, F., Verneau, F., Videbæk, P. N., Amato, M. and Grunert, K. G. (2020). A self-report measure of attitudes toward the eating of insects: Construction and validation of the Entomophagy Attitude Questionnaire. *Food Quality and Preference*. Vol. 79, 103757. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103757>.
- Mankan, E. (2017). Gastronomide Yeni Trendler –Yenilebilir Böcekler. *Journal of Turkish Studies*. 12 (3): 425-440. <http://dx.doi.org/10.7827/TurkishStudies.11431>
- Nicklaus, S. (2011). Children’s Acceptance of New Foods at Weaning. Role of Practices of Weaning and of Food Sensory Properties. *Appetite*, 57: 812-815.
- Orkus, A., Wolanska, W., Harasym, J., Piowar, A., Kapelko, M., (2020). Consumers’ attitudes facing entomophagy: polish case perspectives. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 17 (7). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072427>.
- Özkan, M. (2019). Alternatif Gıda Kaynaklarının (Böcekler) Kullanımına Dair Bakış Açılarının Değerlendirilmesi: Konya Örneği. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Pollan, M. (2007). The Omnivore’s Dilemma: A Natural History of Four Meals. London: The Penguin Press
- Ramos, J. (1997). Insects: a Sustainable Source of Food. *Ecology of Food and Nutrition*, 36, 247-276. <https://doi.org/10.1080/03670244.1997.9991519>
- Ramos-Elorduy, J. (1998) Creepy Crawly Cuisine: The Gourmet Guide to Edible Insects. Rochester, Paris: Park Street Press.
- Ryu, J. P., Shin, J. T., Kim, J. and Kim, Y. W. (2017). Consumer preference for edible insect- containing cookies determined by conjoint analysis: An exploratory study of Korean consumers. *Entomological Research*. 47(2), 74- 83.
- TC. Tarım ve Orman Bakanlığı (2008). Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt-1. Erişim Tarihi: 16.04.2024. Retrieved from <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/Teknik%20tal%C4%B1matlar%202008/C%C4%B0LT%201.pdf>
- Wilkinson, K., Muhlhausler, B., Motley, C., Crump, A., Bray, H., Ankeny, R., (2018). Australian consumers’ awareness and acceptance of insects as food. *Insects*. 9 (2). <https://doi.org/10.3390/insects9020044>.
- Yazici, G.N., Ozer, M.S. (2021). Using Edible Insects in the Production of Cookies, Biscuits, and Crackers: A Review. *Biol. Life Sci. Forum*, 6, 80. <https://doi.org/10.3390/Foods2021-10974>
- Yılmaz, İ., Yalçın , E., (2022). Evaluation of Individuals’ Perspectives and Preferences for Entomophagy. *Journal of Food and Feed Science – Technology*. 28:38-46 (2022/2)



The Determinants of Recall Event Timing of Contaminated Frozen Poultry Products in Retail Outlets in North-Central Nigeria

Emeka Solomon Fidelis^{1,a,*}, Moradeyo Adebajo Otitoju^{1,b}, Park Odojoma Idisi^{1,c},
Ugochukwu Emmanuel Anazo^{2,d}, David Ocholi Achemu^{1,e}

¹University of Abuja, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Economics, P.M.B. 117, Abuja, Federal Capital Territory, Nigeria.

²University of Abuja, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, P.M.B. 117, Abuja, Federal Capital Territory, Nigeria.

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Research Article

Received : 16.05.2024

Accepted : 01.08.2024

Keywords:

Event-Timing

Frozen Poultry Products (FPPs)

Recall

Retail Outlets

Contamination

This study examined the determinants of the recall event timing of contaminated frozen poultry products in retail outlets in North-Central Nigeria. It specifically identified the potential sources of frozen poultry product hazards in retail outlets, assessed the effectiveness of existing management strategies employed by retailers in preventing frozen poultry product recall in the outlets, and examined the factors influencing the recall event timing of contaminated frozen poultry products in retail outlets in the study area. Multistage sampling was employed to sample 202 respondents, and the data collected using a well-structured questionnaire was analyzed using descriptive statistics and discrete-time survival analysis. The results showed that most of the frozen poultry product retailers in outlets in the study area were men within the age bracket of 21 and 40 years and had a monthly restocking frequency of approximately four times. The result revealed that power outage was the highest potential source of hazards associated with frozen poultry products in retail outlets in the study area. Packaging poultry products before freezing, product labelling, and fridge segmentation are effective management strategies. The result of the factors influencing the recall event timing of contaminated frozen poultry products in retail outlets showed that retailing experience ($P < 0.01$) and cooperative membership ($P > 0.01$) significantly influenced the recall event timing of contaminated frozen poultry products in the study area. The study recommends that the Government offer tax incentives to retailers investing in reliable backup power solutions and provide guidelines for effective communication during recall events.

^a solomonemekafidelis@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0003-4276-2735>

^c idisi2013@gmail.com

^d <https://orcid.org/0009-0008-5662-8397>

^e achemudavid@gmail.com

^e <https://orcid.org/0009-0005-8155-9475>

^b moradeyo.otitoju@uniabuja.edu.ng

^c <https://orcid.org/0000-0002-3444-1870>

^d dranasoeb@gmail.com

^e <https://orcid.org/0009-0001-6886-8557>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

The Nigerian agricultural sector accounted for about 21.66% of the country's Gross Domestic Product (GDP) in the first quarter of 2023 (National Bureau of Statistics [NBS], 2023). With an estimated population of around 223.8 million, a national population growth rate of 2.41% per annum, an average economic growth rate of 3.6% per annum (World Bank, 2023). The poultry sub-sector is an integral part of the Nigerian agricultural economy, contributing an estimated 40.6% of total food production, which is 337.3 million tons of poultry meat and eggs in 2020, with the majority of production coming from small-scale farmers who engage in semi-intensive or intensive farms (United Nations Food and Agriculture Organization [FAO], 2020); thus, the sub-sector helps to reduce poverty and improve rural households' living standards (FAO, 2018). The worldwide poultry sub-sector was valued at

\$322.55 billion in 2021, with a projected Compound Annual Growth Rate (CAGR) of 3.8%; it is forecast to reach \$422.97 billion by 2025, with a CAGR of 7% (Feed Additive, 2021).

The Poultry Association of Nigeria (PAN) asserted that the sector, directly and indirectly, employs over 25 million people (The Guardian, 2021), and PAN later estimated that poultry accounts for around 13.99% of the country's overall meat consumption in 2021 (Olowa, 2021). Poultry products are high in protein (Bordoni & Danesi, 2017), and Nigeria is a large, expanding, and sustainable market for frozen poultry products. Moreover, no religious or cultural practices in Nigeria prohibit poultry products from being added to the human diet. Hence, nearly all Nigerians are prospective customers of frozen poultry products.

Abdulraheem et al. (2016) linked Nigeria's low animal protein intake, well below the FAO's minimal recommendation of 53.8g/day, to larger household sizes, illiteracy, and poverty. Since Clarence Birdseye brought quick-frozen meals to the public in 1912, frozen food has been an excellent means of preservation; with refrigerators and deep freezers in the twentieth century, the popularity of frozen products is increasing. The frozen poultry products industry in Nigeria is rapidly growing, offering accessible protein sources to Sub-Saharan Africa, making them highly desired and valued exports; in fact, the Nigerian Export Promotion Council (NEPC) noted that demand for Nigerian frozen poultry products is growing in neighbouring countries, creating export opportunities for the country (Ibirogbu & Ikhaghlu, 2022). Moreso, frozen poultry products are in high demand among fast food providers such as hotels, restaurants, and supermarkets, and according to Foraminifera Market Research Limited (2016), almost 50 million Nigerians use imported frozen chicken, turkey, and fish daily.

Frozen poultry products (FPPs) refer to numerous sorts of poultry products preserved by freezing, converting moisture to ice to stop food degradation within an optimal storage range of -18°C to -20°C (Mercier et al., 2017) and inhibit the development of most bacteria for preservation (Willenberg & Mills-Gray, 2019). FPPs may contain hazardous germs such as *Salmonella* and *Campylobacter*, which can cause severe sickness if not carefully kept below 40°F until ready to cook (Food and Drug Administration [FDA], 2021). FPPs such as frozen turkey meat, chicken meat, and chicken nuggets are popular protein sources in Nigeria and abroad (Agbebi, 2010; Bektas et al., 2011). FPPs provide convenience, a longer shelf life, and a variety of alternatives (Agbebi, 2010; Bektas et al., 2011). According to Hussein et al. (2020), FPPs can last up to 9 months depending on freezer conditions and packaging, whereas cooked goods only last four days and raw products just 1 to 2 days.

According to the Centers for Disease Control and Prevention, [CDC] (2021), poultry products are among the primary sources of foodborne diseases. The worldwide avian influenza epidemic in 2016, notably in China, drastically impacted the global poultry supply, affecting 13.6% of output (Chatziprodromidou et al., 2018). In Nigeria, two crucial events influenced the industry: the 2003 prohibition on imported frozen chicken products, which strengthened the domestic market, and the Avian Influenza outbreak in 2007.

Retail stores are critical in sustaining FPPs' safety requirements (Karshima, 2013; Oloso, 2020). They serve as the final link in the supply chain before items are delivered to customers, and the most significant pricing margin occurs at the retail level in the frozen chicken products supply chain (Bertrand et al., 2018). Donelan et al. (2016) noted that retailers ensure suitable storage conditions, handling methods, and quality control systems are in place to reduce the risk of contamination and maintain the freshness and safety of FPPs. Effectively managing FPPs at retail outlets is crucial to guaranteeing food safety and reducing the potential of product recalls. Hence, businesses like Chi Farms and Amo Farm invest in advanced training programmes to encourage Nigeria's best chicken storage practices (Onyesi, 2021).

Product recall is a response to a product-harm crisis, and it is described as an action taken by a manufacturer or distributor to withdraw a product from the market because it may cause health and safety issues, as well as perhaps death, to customers (Anwar, 2014; National Medical Products Administration, 2007). Product recalls can occur in a variety of settings, including online, offline, required, and voluntary recalls and various forms of recalls may have varied consequences when food recalls occur (Bortoli & Freundt, 2017; Hu et al., 2017; Liu & Ma, 2016). Amid e-commerce rapid expansion, Liu and Ma (2016) found news media disclosing food safety incidents, fostering public concerns, and spurring recall action by governments and businesses.

Complex supply networks can significantly amplify the impact of product recalls, leading to stock drops, brand damage, and heightened sensitivity from rivals (Steven et al., 2014; Singh, 2018; Cheah et al., 2011; Souza-Monteiro & Hooker, 2012). This amplification shows the importance of food recalls in protecting public health. With Africa experiencing approximately 91 million cases of foodborne diseases annually and 137,000 fatalities (World Health Organization [WHO], 2023), and Nigeria's hospital data indicating that 30% of health cases are foodborne (Akinwale et al., 2020), effective food recall systems are crucial. They serve as a vital measure to mitigate the risks posed by food safety issues within complex supply chains and safeguard public health.

Food safety is a critical global issue, and various regulatory bodies work to uphold standards to protect public health. For instance, international recalls such as El Abuelito Cheese in early 2021 due to contamination concerns (FDA, 2021) and International Golden Foods' recall of Al Kanater tahini (FDA, 2021) illustrate the global efforts to address food safety risks. Similarly, Three Squirrels recalled pine nuts for excessive hydrogen dioxide in China (State Administration for Market Regulation [SAMR], 2021). In Nigeria, agencies like the National Agency for Food and Drug Administration and Control (NAFDAC) and the Standards Organization of Nigeria (SON) are crucial in maintaining food safety standards and preventing the importation of expired frozen meat. For example, NAFDAC's recall of a chicken sausage sandwich in July 2019 due to potential Norovirus infection from China highlights the ongoing vigilance required to safeguard public health.

The FDA classifies food product recalls into three categories based on the likelihood of adverse health consequences and depending on the agencies that seek the recall: voluntary recall by enterprises and mandated recall by the Government (Kong et al., 2019). When food producers/distributors find an issue, they accept responsibility, halt production, and alert authorities and the public (Lu & Zhang, 2010; SAMR, 2021). Governments' authority may step in for non-compliance (FDA, 2021).

Several studies on the potential sources of hazards in poultry products have been conducted (Bohaychuk et al., 2006; Ishola & Taiwo, 2014; Mund et al., 2017; Ricke, 2020), but none of these studies focused on FPPs retail outlets. In food contamination, generally, there is a research gap regarding the identification of potential sources of contamination in retail outlets for FPPs. Da

Silva et al. (2021) studied the risk of transmission of *Salmonella spp* in chilled broilers in supermarkets in Brazil, and Green et al. (2013) evaluated the frequency of inadequate chicken cross-contamination prevention and cooking practices in restaurants in the United States. None of the studies mentioned has focused on identifying and assessing specific contamination sources in the context of FPP retail outlets, particularly in Nigeria.

Nigerian FPP retail shops may recall spoiled goods to prevent bad press, complaints, lawsuits, and image damage. The timing of a product recall issue might have significant ramifications for both merchants and customers. According to an FDA study, the timing of a recall event may determine the severity of the consequences for affected individuals and the financial impact on the company (FDA, 2021). Though product recalls often occur in retail outlets, more studies are needed to investigate the variables that lead to the incidence of product recall events in Nigerian FPPs retail stores. Studies like Lutz et al. (2020) sought to identify the specific characteristics that lead to product recalls in the context of *Salmonella* outbreaks in Vancouver, Canada. Walley et al. (2014) investigated UK consumers' purchase behaviours, attitudes, and decision-making variables for poultry products.

All these aforementioned studies were conducted mainly in Western nations, and literature on the topic remains scarce. Given the limitations of the existing literature, there is a need for a study that specifically provides insights into the management strategies' effectiveness and the potential sources of contamination that could lead to a recall event of FPP recalls in retail outlets. Thus, this study aimed to analyse the determinants of recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in North-Central Nigeria. It specifically identified the socioeconomic characteristics of the FPPs retail outlets in the study area, identified the potential sources of FPPs hazards in retail outlets in the study area, assessed the effectiveness of existing management strategies employed by retailers in preventing FPP recalls in the outlets in the study area, and examined the factors influencing the recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in the study area. The null hypothesis that there is no significant relationship between the socioeconomic characteristics of retailers and the recall event timing of contaminated FPPs in outlets in the study area was tested.

The Nigerian agricultural sector significantly contributes to the GDP, with the poultry sub-sector playing a crucial role in food production and poverty reduction, particularly among small-scale farmers. Despite a growing market for frozen poultry products in Nigeria and neighbouring countries, challenges such as power outages and complex supply chains pose risks to food safety. Effective management and recall strategies are essential to mitigate these risks, but existing literature lacks a focused study on contamination sources and recall management in Nigerian FPP retail outlets. This study addressed these gaps by analysing the factors influencing recall event timing, management strategies, and contamination sources, highlighting the need for robust food safety measures in Nigeria.

Materials and Methods

Ethical Approval

Ethical approval was obtained after presenting the proposal seminar (UA/FA/AEC/POS/Vol. 5/0015) on the 13th of September, 2023 at the University of Abuja, Nigeria. The university granted approval as part of a dissertation. The research conduct was carefully reviewed to ensure it adhered to international standards for food-related research.

Study Area

The study was carried out in the North-Central region of Nigeria. The area has seven States, namely Federal Capital Territory, Benue, Kwara, Kogi, Nasarawa, Niger, and Plateau. It is between arid north and moist south with temperatures ranging from 18°C – 37°C yearly and rainfall ranging from 1000mm to 1500mm per annum. It is known as the nation's flourishing agricultural produce area. Two (2) selected areas in the region are Abuja and Nasarawa. The elevated urban activities within Abuja, the nation's capital, coupled with the strategic positioning of outlets in Nasarawa state proximate to its border with Abuja, effectively serving as a feeder to the Abuja metropolis, render Abuja and Nasarawa a compelling scenario for the conducted study.

Abuja, the Federal Capital Territory (FCT), is between Longitude: 7°23.9144' E and Latitude: 9°4.5887' N. It has an area of around 8000 km² and a mean elevation of 476 m above sea level (Nigerian Gross Open Data for Africa, 2020). Abuja is bounded on the east by Nasarawa, north by Kaduna, west by Niger, and south by Kogi. It is 476 meters above sea level (Owolabi et al., 2020), with a population of 3,840,000 (Microtrend, 2022). Nasarawa state is located at Latitude 8°32'20.22" N and Longitude 7°42'29.56" E. It covers an area of approximately 27,137.8 km² and has a population of 2,886,097 (City Population, 2022). Nasarawa State is bordered by Kaduna State in the north, Plateau State in the east, Benue State in the east, and Kogi State in the west (Kalra et al., 2008). Abuja is split into six area councils: Abaji, Bwari, Kuje, Gwagwalada, Kwali, and AMAC. AMAC is an abbreviation for Abuja Municipal Area Council, one of Abuja's local government areas, while Nasarawa State is divided into 13 Local Government Areas, which are Akwanga, Awe, Obi, Karu, Nasarawa, Nasarawa Eggon, Keffi, Wamba, Doma, Lafia, Kokona, Toto and Keana.

According to Boumphrey (2010), Abuja grew by 139.7% between 2000 and 2010, making it one of the world's fastest-growing cities. The city's population rises yearly, forming satellite towns such as Suleja, Gwagwalada, Lugbe, Kuje, and other minor communities. Nasarawa State, on the other hand, is quickly becoming a top investment destination, owing to its constant business-friendly policies, strong government backing, and the state's high degree of security due to its closeness to the nation's capital. Nasarawa State is highly inhabited, particularly along the Karu axis, Mararaba, and new Nyanya (Onyedinefu, 2022). Onyedinefu (2022) noted that karu is not only commercially feasible, but it also guarantees investors reliable and long-term returns on investment.

Sampling Procedures and Sample Size

The study used the multistage sampling technique. In the first stage, three (3) markets known for their high relative intensity of FPPs retailing outlets were selected purposively from within Abuja and Nasarawa state. To ensure these markets captured the full range of FPP retailing activities, including direct selling, refrigerating/freezing, cold chain logistics, and retailing, data collection was conducted across different times and vendor types within each market. Wuse, Garki, and Kado markets were selected in Abuja, while Masaka, New Nyanya, and Mararaba international markets were selected in Nasarawa state. In the second stage, the list of active FPP retail outlets within the last 12 months was compiled from the various market associations. The compilation of the lists constitutes the sample frame for the study. Table 1 below summarises the FPPs retail outlets in the selected Abuja and Nasarawa state markets.

As shown in Table 1 below, the sample frame is 202 active frozen poultry products retail outlets. A census approach was adopted as the sampling technique to survey all 202 FPP retailers in the market for comprehensive representation and in-depth analysis of the entire sampled population. Thus, the study’s sample size was 202 FPP retailers in Nasarawa state and Abuja. The data for this study was gathered from primary sources through personal interviews using a well-structured questionnaire.

Method of Data Analysis

Descriptive statistics such as tables, frequency, percentages, mean, and the Cox proportional hazards regression in the Discrete-Time Survival Analysis were used to achieve the various objectives of the study.

Discrete-Time Survival Analysis

Figure one gives a pictorial view of the survival analysis scheme on the retail outlets, arrival from larger cold rooms to the retail outlet freezers, that is, the end of the study period.

Predictor variables: age, sex, preventive measures and management strategies

Y_t = dependent variable; Y_t (age, sex, preventive measures and management strategies)

Event of interest = recall of frozen poultry products

$$\delta = 0 \begin{cases} 0, \\ 1, \end{cases}$$

0= Censored did not obtain the event of interest

1= Failure obtained the event of interest i.e recall of frozen poultry products

The Cox proportional hazards regression in the discrete-time survival analysis was used to identify the factors influencing the recall event timing of contaminated FPPs in the study area.

Table 1. Distribution of the frozen poultry products retail outlets in the selected markets

S/N	States	Markets	Retailers
1	Abuja	Wuse market	25
2	--	Garki market	28
3	--	Kado market	57
4	Nasarawa	Masaka market	33
5	--	Mararaba international market	24
6	--	New Nyanya market	35
		TOTAL	202

Source: Compiled by the Researchers

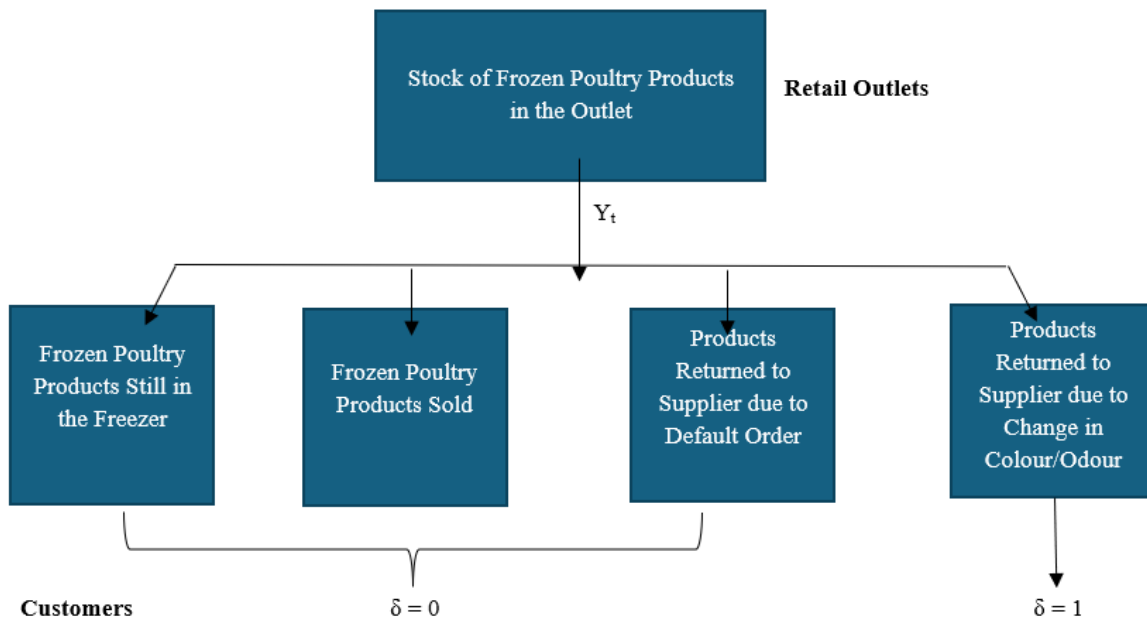


Figure 1. Survival model for biomedical data

The Cox proportional hazards regression, a semiparametric model, is the most often used regression model for studying survival data (Kleinbaum & Klein 2012). Mathematically, the Cox proportional hazards model can be represented as follows:

$$H(t) = Pr(t \leq T < t + T \geq t) \quad (1)$$

Where: T is a discrete random variable indicating the event's occurrence time (which was measured in days for this study). The Cox model can be estimated using the following regression:

$$h(t|X) = h_0(t) \cdot \exp(\beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n) \quad (2)$$

where $h(t|X)$ represents the hazard rate or hazard function for an individual retailer with a specific set of covariate values (X_1, X_2, \dots, X_n), $h_0(t)$ is the baseline hazard function that represents the hazard for an individual retailer with all covariates equal to zero, and $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ are the estimated coefficients associated with each covariate X_1, X_2, \dots, X_n . This study specified the baseline hazard function as the logarithm of time:

$$\ln(t) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{10} X_{10} + u_i \quad (3)$$

Where:

$\ln(t)$ is the complementary log transformation of the baseline hazard (logarithm of discrete event occurrence time).

t = time before the recall event occurrence (days)

X_1 = FPPs retailing experience (years in the FPPs business).

X_2 = Total number of freezers owned in the outlet

X_3 = FPPs retail outlet freezer capacity (in kilogram)

X_4 = Sex of the FPPs outlet retailers (1 for male, 0 for otherwise)

X_5 = Age of the FPPs outlet retailers (years)

X_6 = Years of education (Number of years in school)

X_7 = Cooperative membership (1 for membership, 0 for otherwise)

X_8 = Retail outlet's source of FPPs (1 for larger cold rooms, 0 for otherwise)

X_9 = Source of product safety information (1 for official notification from government agencies, 0 for otherwise)

X_{10} = Total number of FPPs purchased per month (in kilogram)

β_0 = intercept,

$\beta_1 - \beta_{10}$ = coefficients/parameter estimates.

Results and Discussion

The Socioeconomic Characteristics of the FPPs Retail Outlets

In Table 2, the socioeconomic characteristics of the FPP retail outlets in the study area showed that the majority of the FPP retailers in outlets in the study area were men. This finding implies that FPP retail outlets in the study area are dominated by men, which is consistent with the results of Msetule et al. (2017), who made similar findings in their study of contamination of frozen broiler chicken meats with antimicrobial-resistant thermophilic campylobacter in Tanzania. The mean age of the FPP retailers is

approximately 42 years, implying that the majority of them are economically active members of the population and thus constitute a reasonable labour force for the FPP outlets capable of coping with the challenges and management strategies associated with recall event and hazard prevention activities in the study area. These findings corroborated Olutegbe et al. (2021) argument that people in their forties and fifties are nimbler and more risk-taking than the old.

The respondents' educational attainment showed that the mean number of years spent in school by the FPP retailers is approximately 13 years, implying that an average retailer in the outlets had attained secondary education, which takes at least 12 years to complete. This suggests that the FPP retailers in the sampled outlets are literate. Education has been found to raise human capital levels and give the essential skills for profit or self-employment value chain exploration (Makame et al., 2018). The mean number of years of frozen poultry product retailing experience was approximately 11 years. This implies that the average frozen poultry retailer in the research area has been in business for at least ten years. Experience levels, according to Ali et al. (2021), can impact corporate management and decision-making. Retailers with more experience may have better insights into industry trends and knowledge that can be translated into enhanced management strategies that could prevent FPP contamination.

Table 2 also shows that the mean number of freezers in FPPs retailing outlets in the study area is approximately 5 freezers. The number of freezers affects storage capacity and, consequently, the scale of retail operations. According to Madushani and Howshigan (2020) and Yang and Tang (2023), retailers with more refrigerators may have the potential to offer a more comprehensive product range.

The mean freezer storage capacity and monthly restocking frequency are approximately 84kg and 4 times per month, respectively. Nwaike and Ejechi (2022) and Cahyati and Mahendra (2020) asserted that restocking frequency influences inventory management and product availability.

Additionally, Table 2 also revealed that the retail outlets in the study area offer various types of FPPs, with chicken wings, turkey wings, and chicken laps being the most common. A significant percentage of respondents are cooperative members. Cooperative membership can influence supply chain dynamics and access to resources. Retailers who are cooperative members may have different sourcing advantages (Schulze & Spiller, 2021).

The Potential Sources of FPPs Hazards in Retail Outlets

The result of the potential sources of hazards associated with FPPs in retail outlets in the study area is presented in Table 3. The table revealed that Power Outage (26.32%) is the highest potential source of hazards associated with FPPs in retail outlets in the study area; this is closely followed by Electrical Fault (21.48%). Power outages and electrical faults, such as equipment malfunction or electrical fires, disrupt refrigeration systems, leading to temperature fluctuations that may compromise the safety of FPPs (FDA, 2021).

Table 2. Frequency Distribution of the Socioeconomic Characteristics of the FPPs Retailer in Outlets in the Study Area

Variable	Frequency	Percentage	Mean Value
Sex			
Female	76	37.62	
Male	126	62.38	
Total	202	100	
Age Range (years)			42.30
21-30	33	16.34	
31-40	65	32.18	
41-50	54	26.72	
51-60	45	22.28	
61-70	5	2.48	
Total	202	100	
Retailing Experience (years)			10.49
1-8	88	43.56	
9-16	80	39.60	
17-24	32	15.84	
25-32	2	0.99	
Total	202	100	
Number of Years in School (years)			12.99
1-5	12	5.94	
6-10	29	14.36	
11-15	85	42.08	
16-19	76	37.62	
Total	202	100	
Number of Freezers			4.92
1-3	39	19.31	
4-6	125	61.88	
7-9	38	18.81	
Total	202	100	
Freezer Capacity (kg)			83.85
40-60	20	9.95	
61-81	77	38.31	
82-102	104	51.74	
Total	201	100	
Monthly Restocking Frequency (time per month)			3.96
1-3	65	40.88	
4-6	86	54.09	
7-9	8	5.03	
Total	159	100	
Type of FPPs Retailed			
Chicken Wings	113	19.12	
Turkey Wings	187	31.64	
Chicken Laps	178	30.12	
Whole Chicken	113	19.12	
Total	591	100	
Cooperative Membership			
No	73	35.64	
Yes	130	64.36	
Total	202	100	

Source: Computed from Field Data, 2024.

Other potential sources of hazards associated with FPPs in retail outlets in the study area include temperature abuse (9.96%), cross-contamination (6.97%), improper handling (5.97%), packaging defects (5.83%), lack of proper cleaning and sanitation (5.55%), employee hygiene (4.27%), competition (4.13%), and inadequate storage conditions (3.70%). Temperature abuse involves improper storage and handling of FPPs, leading to temperature fluctuations that can promote bacterial growth and spoilage (FDA, 2021). Inadequate cleaning and sanitation practices and improper handling of FPPs can result in physical

damage, cross-contamination of pathogens from one development surface to another, thawing, and packaging defects, increasing the risk of product hazards (Gouda et al., 2020). This result also resonates with Harmse et al. (2016) assertion that competition among outlets in the same market can lead to price pressure and potentially impact food safety if retailers compromise product quality or safety measures to reduce costs.

Diseases (3.56%) and Inadequate pest control (2.28%) were the least of the potential sources of hazards associated with FPPs in retail outlets in the study area. This implies

that retailers in the study area have optimised their storage conditions and implemented effective pest control to ensure proper organisation and access while maintaining product safety. The result on the awareness of contaminated FPP-borne illnesses in Table 3 revealed that a significant majority (79.70%) of respondents are aware of diseases associated with contaminated FPPs. This high awareness suggests that the retail outlets are conscious of the risks associated with these products. Thus, an effective management strategy must be employed to prioritise food safety measures to prevent product recalls.

The most common sources of product safety information are official notifications from government agencies (79.70%), followed by market associations (7.43%) and social media (5.45%). The result points to the crucial role of government agencies in disseminating safety information. Most respondents (79.70%) have recalled FPPs in the last 12 months. This underscores the importance of maintaining strict food safety practices throughout the FPP supply chain (Bukachi et al., 2021). Table 3 also showed that the majority (79.70%) of respondents expressed a willingness to recall contaminated FPPs. According to Bukachi et al. (2021), retailers' desire to recall products demonstrates their concern for food safety and the trust of their customer base.

The Effectiveness of the Existing Management Strategies Employed by Retailers in Preventing FPP Recall in the Outlets

The results in Table 4 above provided insights into the perceived effectiveness of existing management strategies employed by retailers in preventing FPP recalls in the outlets in the study area. The mean value of packaging poultry products before freezing (3.81) indicated that the majority of the retailers in outlets in the study area strongly agree that packaging poultry products before freezing strategy is an effective measure. This suggests proper packaging can be a robust preventive measure for product recall. Most respondents agree that product labelling and fridge segmentation are effective management strategies (3.13). According to Karalliyadda and Kazunari (2020), labelling and organisation can improve product safety.

The respondents agreed that encouragement of customer feedback (2.97), fostering a culture of safety and accountability (2.92), regular communication with suppliers (2.91), and staying up to date on industry regulations and standards (2.90) are all effective management strategies employed in preventing FPP recalls in their outlets. These allow for early detection of potential issues (Fistarol et al., 2015).

Table 3. Distribution of the Sources of FPP Hazards in Retail Outlets in the Study Area

Potential Hazard Sources	Frequency	Percentage (%)
Diseases	25	3.56
Cross-contamination	49	6.97
Temperature abuse	70	9.96
Improper handling	42	5.97
Competition	29	4.13
Electrical fault	151	21.48
Inadequate storage conditions	26	3.70
Power outage	185	26.32
Packaging defects	41	5.83
Lack of proper cleaning and sanitation	39	5.55
Employee hygiene	30	4.27
Inadequate pest control	16	2.28
Total	703*	100
Awareness of Contaminated FPPs-Borne Illnesses		
Yes	161	79.70
No	41	20.30
Total	202	100
Sources of Product Safety Information		
News	2	0.99
Social media	11	5.45
Official notifications from government agencies	161	79.70
Market associations	15	7.43
follow retailers	11	5.45
Customers	2	0.99
Total	202	100
FPP Recall Within the Last 12 Months		
Yes	161	79.70
No	41	20.30
Total	202	100
Willingness to Recall Contaminated FPPs		
Yes	161	79.70
No	41	20.30
Total	202	100

*Multiple Response; Source: Computed from Field Data, 2024.

Employee training on handling and storage and establishing a product recall system strategy, with a mean of 2.87, agreed they are both effective. Well-trained staff can minimise mishandling and contamination risks. Also, strict quality control measures (2.86), regular inspections and auditing (2.84), and regularly reviewing and revising Procedures (2.84) were effective management strategies employed by retailers in preventing FPP recalls in the outlets in the study area. Stringent quality checks can help identify and prevent contaminated products from reaching consumers (Niyonzima et al., 2015).

Most respondents agree that special safety conditions during product preparation (2.81) and clear labelling and signs (2.80) are effective management strategies. This highlights the importance of hygiene, proper labelling, and safety protocols during food preservation to convey important safety information to consumers (Teffo & Tabit, 2020).

Factors Influencing the Recall Event Timing of Contaminated FPPs in Retail Outlets

To examine the factors influencing the recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in the study area, some variables: Sex of the FPP outlet retailers, age of the FPP outlet retailers, number of years in school, Cooperative membership, Retail outlet’s source of FPPs, Total number of freezers own in the outlet, FPPs retail outlet freezer capacity, source of product safety

information, Total number of FPPs purchased per month and FPPs retailing experience were regressed against the time in days leading to the FPPs recall event in retail outlets in the study area, in a Cox regression survival analysis and the result presented in Table 5.

The log-likelihood, which measures how well the Cox proportional hazards model fits the survival test, has a value of 1569.477 in Table 5, suggesting that the model provides a relatively good explanation of the observed survival times and recall indicators. The chi-square value of 27.984 shows that the overall Cox proportional hazards model is statistically significant at the 1% significance level, indicating that the model provides an excellent fit to the explanatory variables and explains recall event timing.

Five (5) out of the ten (10) variables in the model statistically significantly influenced the recall event timing of contaminated FPPs in the study area. Retailing experience (-1.252) is significant at 1%, cooperative membership (0.297) and total number of FPPs purchased per month (0.424) were significant at 5%, Freezer capacity (-0.946) and source of FPPs (0.335) were significant at 10% in relation to the recall event timing of contaminated FPPs in the study area. This led to the rejection of the null hypothesis that there is no significant relationship between the socioeconomic characteristics of retailers and the recall event timing of contaminated FPPs in outlets in the study area.

Table 4. Distribution of the Effectiveness of Existing Management Strategies Employed by Retailers in Preventing FPP Recall in the Outlets in the Study Area

Management Strategies	SA	A	D	SD	MV	R
Packaging poultry products before freezing effectively prevents poultry product contamination/recall in retail outlets.	167(82.67)	32(15.84)	3(1.49)	0(0.00)	3.81	SA
Product labelling and fridge segmentation effectively prevent poultry product contamination/recall in retail outlets.	36(18.27)	151(76.65)	10(5.08)	0(0.00)	3.13	A
Poultry product preparation under special safety conditions effectively prevents contamination/recall in retail outlets.	29(17.26)	82(48.81)	53(31.55)	4(2.38)	2.81	A
Implementing strict quality control measures prevents FPP contamination/recall in retail outlets.	35(18.52)	95(50.26)	56(29.63)	3(1.59)	2.86	A
Employee training on proper handling and storage of frozen products is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets.	33(18.23)	96(53.04)	48(26.52)	4(2.21)	2.87	A
Regular inspections and auditing of outlets is an effective measure for curtailing your frozen product contamination/recall in retail outlets	30(16.67)	95(52.78)	51(28.33)	4(2.22)	2.84	A
The clear labelling and signs on FPPs have been effective in preventing product contamination/recall in retail outlets	23(12.43)	107(57.84)	50(27.03)	5(2.70)	2.80	A
The establishment of a product recall system in FPP retail outlets is effective in preventing product contamination/recall	31(17.42)	96(53.93)	48(26.97)	3(1.69)	2.87	A
Regularly communicating with suppliers is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets	31(16.67)	111(59.68)	40(21.51)	4(2.15)	2.91	A
The encouragement of customer feedback is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets	38(20.88)	102(56.04)	40(21.98)	2(1.10)	2.97	A
Staying up to date on industry regulations and standards is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets	33(18.23)	101(55.80)	43(23.76)	4(2.21)	2.90	A
Fostering a culture of safety and accountability is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets	31(16.76)	113(61.08)	37(20.00)	4(2.16)	2.92	A
Regularly reviewing and revising procedures is an effective measure for preventing product contamination/recall in retail outlets	24(12.63)	116(61.05)	46(24.21)	4(2.11)	2.84	A

MV: Mean value; R: Remark; SA=Strongly Agreed, A=Agreed, D=Disagreed, SD=Strongly Disagreed; %ages (%) in bracket; Source: Computed from Field Data, 2024.

Table 5. Result of the Factors Influencing the Recall Event Timing of Contaminated FPPs in Retail Outlets in the Study Area

Explanatory variables		Coefficients	S.E	Wald	Df	Exp(β)
Retailing experience (X_1)	β_1	-1.252***	0.488	6.581	1	0.286
Total number of freezers in the outlet (X_2)	β_2	1.541	1.233	1.563	1	4.67
Freezer capacity (X_3)	β_3	-0.946*	1.067	2.786	1	0.388
Sex (X_4)	β_4	0.063	0.175	0.128	1	1.065
Age (X_5)	β_5	0.295	1.032	0.081	1	1.343
Number of years in school (X_6)	β_7	0.249	0.398	0.392	1	1.282
Cooperative membership (X_7)	β_8	0.297**	0.212	3.963	1	1.346
Source of product safety information (X_8)	β_9	0.227	0.226	1.007	1	1.255
Source of FPPs (X_9)	β_{10}	0.335*	0.192	3.044	1	1.398
Total number of FPPs purchased per month (X_{10})	β_{11}	0.424**	0.429	4.974	1	1.528
Chi-square				27.984***		
Log Likelihood				1569.477		
Number of Observation		202				

*** = $P < 0.01$, ** = $P < 0.05$, * = $P < 0.1$, S.E = Stands for Standard Error, df = degree of freedom; Source: Computed from Field Data, 2024.

The coefficient of retailing experience (-1.252) is significant at 1% and negatively influences the recall event timing of contaminated FPPs in the study area. This suggests that retailing experience is a strong predictor of recall event timing. A negative coefficient indicates that as the retailing experience increases, the recall's hazard (risk) decreases significantly. This implies that experienced retailers are less likely to experience recall events. This result aligns with the idea that experienced retailers may have better quality control measures and processes in place, reducing the likelihood of contaminated products reaching consumers. This aligns with prior research indicating that experienced retailers often have more robust quality control measures (Lima et al., 2016).

The coefficient of cooperative membership (0.297) is significant at 5% and positively influences the recall event timing of contaminated FPPs in the study area. The positive coefficient implies cooperative members have a higher recall hazard than non-members. This result is somewhat counterintuitive, as one might expect cooperatives to have stricter quality control; as Yu et al. (2020) noted, cooperatives are generally likely to enforce strict quality control standards. However, it could be due to other unmeasured factors related to cooperatives that increase the recall risk. Also, regulatory enforcement in the study area may not be stringent enough, and cooperatives might not necessarily comply better with food safety regulations than non-members. It may also be possible that members of cooperatives engage in riskier behaviour.

The coefficient of freezer capacity (-0.946) is significant at 10%. It negatively influences the recall event timing of contaminated FPPs in the study area, implying that as freezer capacity increases, the recall hazard decreases. Retailers with larger freezer capacity are less likely to experience recall events. This aligns with the idea that larger facilities may have better storage and handling capabilities. This result also indicates that retailers with larger freezer capacity are less likely to face recall events. This result supports Madushani and Howshigan's (2020) idea that increased storage capabilities contribute to better product handling.

The coefficient of source of FPPs (0.335) is significant at 10% and positively influences the recall event timing of contaminated FPPs in the study area; this positive coefficient suggests that FPPs sourced from larger cold

rooms have a higher hazard of recall than those sourced from other sourced in the study area. Keaton et al. (2022) noted that retail products sourced from different suppliers come with risks associated with that source. The coefficient of the total number of FPPs purchased per month (0.424) is significant at 5%. It positively influences the recall event timing of contaminated FPPs in the study area, indicating that retailers purchasing more FPPs per month have a higher recall hazard. This might be due to increased volume, which leads to higher chances of encountering contaminated products. According to Zhu et al. (2018), higher purchase volumes are associated with an increased recall risk.

Conclusion

This study examined the determinants of recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in North-Central Nigeria. It specifically identified the potential sources of FPP hazards in retail outlets in the study area, assessed the effectiveness of existing management strategies employed by retailers in preventing FPP recall in the outlets in the study area, and examined the factors influencing the recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in the study area. The study showed that most of the FPP retailers in outlets in the study area were men, with a mean age of approximately 42 years. A significant percentage of respondents are cooperative members.

The result revealed that power outage was the highest potential source of hazards associated with FPPs in retail outlets in the study area, closely followed by electrical faults. Also, packaging poultry products before freezing product labelling and fridge segmentation were effective management strategic measures. The result of the factors influencing the recall event timing of contaminated FPPs in retail outlets in the study area showed that retailing experience ($P < 0.01$), cooperative membership ($P > 0.01$), and total number of FPPs purchased per month ($P > 0.01$), significantly influenced the recall event timing of contaminated FPPs in the study area. Thus, the study concludes that there is a significant relationship between the socioeconomic characteristics of retailers and the recall event timing of contaminated FPPs in outlets in North-Central Nigeria.

Based on these findings, the study recommends that retail outlets in the study area should invest in backup power sources such as generators or uninterruptible power supplies (UPS). To encourage their efforts, the Government should offer tax incentives to retailers investing in reliable backup power solutions. Government agencies and cooperatives should provide educational resources to encourage retailers to adopt and prioritise effective management strategies and provide guidelines for effective communication during recall events. Also, retail outlets should be encouraged to optimise their freezer capacity to improve overall storage conditions and potentially reducing the risk of contamination in their outlets.

This study contributes valuable knowledge to the fields of food safety, supply chain management, and retail practices in the frozen poultry product industry. The insights gained can inform policy development, industry best practices, and academic research in related domains. Future studies could expand the geographic scope beyond Abuja and Nasarawa, employing longitudinal and mixed-methods approaches to conduct comparative analyses between urban and rural retail outlets, explore the integration of technology in recall management, behavioral aspects of retailers and consumers, and the economic impacts of recalls, and improve management strategies for frozen poultry product recalls in Nigeria.

Declarations

The authors declare no conflict of interest

References

- Abdulraheem, M. A., Muhammad-Lawal, A., Olasore, A. A. & Oni, O. O. (2016). Assessment of Animal Protein Consumption and Food Security Among Rural Households in Kwara State, Nigeria. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Assessment-of-Animal-Protein-Consumption-and-Food-%2C-Abdulraheem-Muhammad-Lawal/02a1bb8c54ef66eade327d61479ab3b7db72adeb>
- Agbebi, F. O. (2010). Salient Issues in Fish Marketing System in Nigeria. *Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries*, 2(1), 94-105.
- Akinwale, M. E., Onuoha, K. O., Robertson, L. J. & Jokelainen, P. (2020). Opinions and knowledge on globally important foodborne parasites among healthcare professionals at a tertiary teaching hospital in Nigeria. *Food and Waterborne Parasitology*, (18). DOI: 10.1016/j.fawpar.2020.e00075
- Ali, S., Li, G., Yang, P., Hussain, K., & Latif, Y. (2021). Correction: Unpacking the importance of intangible skills in new product development and sustainable business performance; strategies for marketing managers. *PLOS ONE*, 16(9). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257714>
- Anwar, S. T. (2014). Product recalls and product-harm crises: A case of the changing toy industry. *Competitiveness Review: An International Business Journal incorporating Journal of Global Competitiveness*, 24. DOI:10.1108/CR-02-2013-0011
- Bektas, Z. K., Miran, B., Uysal, Ö. K., Günden, C. & Cankurt, M. (2011). Demand analysis for frozen food in Turkey: Case of Izmir. *African Journal of Agricultural Research*, 6(6), 1508-1518
- Betrand, U., Molua, E. & Akem, N. F. (2018). Poultry Price and Market Analysis in the Southwest Region of Cameroon. *Journal of Food Security*. 6. Available at: https://www.researchgate.net/publication/325137509_Poultry_Price_and_Market_Analysis_in_the_South_West_Region_of_Cameroon
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., King, R. K., Manninen, K., Sørensen, O. J., Wu, J. T., Stiles, M. E., & McMullen, L. M. (2006). Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of food protection*, 69(9), 2176-82. DOI:10.4315/0362-028X-69.9.2176
- Bordoni, A., & Danesi, F. (2017). Poultry Meat Nutritive Value and Human Health. *Poultry Quality Evaluation*, p. 279-290. DOI:10.1016/B978-0-08-100763-1.00011-8
- Bortoli, L. V., & Freundt, V. (2017). Effects of Voluntary Product Recall on Consumer's Trust, Brazilian Business Review. *Fucape Business School*, 14(2), 204-224. Available at: <https://ideas.repec.org/a/bbz/fcpbbr/v14y2017i2p204-224.html>
- Boumphrey, S. (2010). World's fastest-growing cities are in Asia and Africa. *Euromonitor Inter*. Available at: <http://blog.euromonitor.com/2012/03/special-report-worlds-fastest-growing-cities-are-in-asia-and-africa.html>
- Bukachi, S. A., Ngutu, M., Muthiru, A. W., Lépine, A., Kadiyala, S., & Domínguez-Salas, P. (2021). Consumer perceptions of food safety in animal source foods choice and consumption in Nairobi's informal settlements. *BMC Nutrition*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40795-021-00441-3>
- Cahyati, S., & Mahendra, D. R. (2020). Design process of dme storage system as assembly parts or maintenance spare parts inventory in offshore oil drilling piping system. *Sinergi*, 25(1), 19. DOI:10.22441/sinergi.2021.1.003
- Centres for Disease Control and Prevention [CDC]. (2021). Foods That Can Cause Food Poisoning. Available at: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foods-linked-illness.html>
- Chatziprodromidou, I. P., Arvanitidou, M., Guitian, J., Apostolou, T., Vantarakis, G., & Vantarakis, A. (2018). Global avian influenza outbreaks 2010-2016: a systematic review of their distribution, avian species and virus subtype. *Systematic reviews*, 7(1), 17. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5784696/>
- Cheah, E. T., Jamali, D., Johnson, J. E. V., & Sung, M. C. (2011). Drivers of corporate social responsibility attitudes: The demography of socially responsible investors. *British Journal of Management*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.14678551.2011.00744.x>
- City Population. (2022). Nasarawa State in Nigeria. Available at: https://www.citypopulation.de/en/nigeria/admin/NGA026_nasarawa/
- Da Silva, S. E. L., Paz, D. S., Bratifich, K. S. B., Sebastião, C., Silva, L., Das G., & Rodrigues, R. A. (2021). Armazenamento térmico de frangos resfriados em supermercados e o risco de transmissão de Salmonella spp / Thermal storage of chilled broilers in supermarkets and the risk of transmission of Salmonella spp. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 10503-10512. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-716>
- Donelan, A. K., Chambers, D. H., Chambers, E. I., Godwin, S. L., & Cates, S. C. (2016). Consumer Poultry Handling Behavior in the Grocery Store and In-Home Storage. *Journal of food protection*, 79(4), 582-8. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-15-282
- Feed Additive. (2021). Global Poultry Industry and Trends. International Magazine For Animal Feed & Additives Industry. Available at: <https://www.feedandadditive.com/global-poultry-industry-and-trends/>

- Fistarol, G. O., Coutinho, F. H., Moreira, A. P., Venas, T. M., Cánovas, A., de Paula, S. E., Coutinho, R., de Moura, R. L., Valentin, J. L., Tenenbaum, D. R., Paranhos, R., do Valle, R. D., Vicente, A. C., Amado Filho, G. M., Pereira, R. C., Kruger, R. H., Rezende, C. E., Thompson, C. C., Salomon, P. S., & Thompson, F. L. (2015). Environmental and sanitary conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Frontiers in Microbiology*, 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01232>
- Food and Agriculture Organization [FAO] (2018) Africa Sustainable Livestock 2050: Livestock and livelihoods spotlight. Nigeria. Cattle and Poultry Sectors. Available at: http://www.fao.org/3/CA2149EN/ca_2149en.pdf.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2020). Meat Market Review, Emerging trends and outlook, December 2020.
- Food and Drug Administration [FDA], (2021). International Golden Foods, Inc (IGF) Recalls Tahini Because of Possible Health Risk. Available at: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/international-golden-foods-inc-igf-recalls-tahini-because-possible-health-risk>
- Foraminifera Market Research Limited. (2016). Bitter Kola Export in Nigeria; Non-Oil Export Opportunity in Nigeria. Available at: <https://foramfera.com/2016/03/04/bitter-kola-export-in-nigeria-non-oil-export-opportunity-in-nigeria/>
- Gouda, A. S., Khattab, A., & Mégarbane, B. (2020). Lessons from a methanol poisoning outbreak in Egypt: six case reports. *World Journal of Critical Care Medicine*, 9(3), 54-62. DOI: <https://doi.org/10.5492/wjccm.v9.i3.54>
- Green, B. L., Khargonekar, S., & Bushnell, L. (2013). Frequency of inadequate chicken cross-contamination prevention and cooking practices in restaurants. *Journal of Food Protection*, 76(12), 2141-5. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-13-129>
- Harmse, J. L., Engelbrecht, J. C., & Bekker, J. L. (2016). The impact of physical and ergonomic hazards on poultry abattoir processing workers: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(2), 197. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph13020197>
- Hu, H., Djebarni, R., Zhao, X., Xiao, L. & Flynn, B. (2017). Effect of different food recall strategies on consumers' reaction to different recall norms: A comparative study. *Industrial Management & Data Systems*, 117, 2045-2063. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/IMDS-10-2016-0464>
- Hussein, H., Salman, M., & Jawad, A. (2020). Effect of freezing on chemical composition and nutritional value in meat. *Drug Invention Today*, 13. Available at: https://www.researchgate.net/publication/339602967_Effect_of_freezing_on_chemicalcomposition_and_nutritional_value_in_meat
- Ibirogba, F., & Ikhaghu, A. (2022). Chicken prices triple as producers, processors list causes. *BusinessAgro*. The Guardian. Available at: <https://guardian.ng/features/chicken-prices-triple-as-producers-processors-list-causes/>
- Ishola, O. O., & Taiwo, A. G. (2014). Frozen Retail Poultry Meat Contact Surfaces as Sources of Salmonella and Escherichia Coli Contamination in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, 2, 81-85. Available at: <http://pubs.sciepub.com/ajidm/2/4/2/index.html>
- Kalra, N., Chakraborty, D., Sharma, A., Rai, H. K. & Jolly, M. (2008). Effect of increasing temperature on yield of some winter crops in North West India. *Current Science Journal*, 94 (1), 82-88.
- Karalliyadda, S., & Kazunari, T. (2020). Compliance of small-scale organic tea farmers with organic standards: a study in Sri Lanka. *Journal of Agricultural Sciences - Sri Lanka*, 15(1), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.4038/jas.v15i1.8668>
- Karshima, N. S. (2013). The Roles of Veterinarians in the Safety of Foods of Animal Origin in Nigeria: a Review. *Journal of Animal Production Advances*, 3, 57-68. DOI: <https://doi.org/10.5455/JAPA.20130330124409>
- Keaton, A. A., Schwensohn, C. A., Brandenburg, J. M., Pereira, E., Adcock, B., Teclé, S., Hinnenkamp, R., Havens, J., Bailey, K., Applegate, B., Whitney, P., Gibson, D., Manion, K., Griffin, M., Ritter, J., Biskupiak, C., Ajileye, K., Golwalkar, M., Gosciminski, M., Viveiros, B., Caron, G., McCullough, L., Smith, L., Vidyaprakash, E., Doyle, M., Hardy, C., Elliot, E. L., Gieraltowski, L. B. (2022). Multistate outbreak of Salmonella Mbandaka infections linked to sweetened puffed wheat cereal – United States, 2018. *Epidemiology and Infection*, 150. DOI: <https://doi.org/10.1017/s095026882200108x>
- Kleinbaum, D. G., & Klein, M. (2012). *Survival Analysis: A Self-Learning Text*. 3rd Edition, Springer, New York. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6646-9>
- Kong, D. M., Shi, L., & Yang, Z. Q. (2019). Product recalls, corporate social responsibility, and firm value: evidence from the Chinese food industry. *Food Policy*, 83, 60–69.
- Lima, M. d., Siga, C., Leitempergher, F., Lerin, L. A., Soares, L. S., Tosati, J. V., Rodrigues, N. B., & Monteiro, A. R. (2016). Mussel (*Perna perna*) processing by an alternative method and packaging under modified atmosphere to improve physicochemical and microbiological characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12923. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12923>
- Liu, P., & Ma, L. (2016). Food scandals, media exposure, and citizens' safety concerns: A multilevel analysis across Chinese cities. *Food Policy*, 63, 102-111. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2016.07.005>
- Lutz, K., Chen, D., & McIntyre, L. (2020). Changes in processing and labelling of frozen chicken products available to consumers in Vancouver. *BCIT Environmental Public Health Journal*. Available at: <https://journals.bcit.ca/index.php/ehj/article/view/22>
- Madushani, N., & Howshigan, S. (2020). A Behavioral Study on Leisure Shopping Purchasing in Supermarket Setup. *Asian Research Journal of Arts & Social Sciences*, 41-51. DOI: [10.9734/arjass/2020/v12i430199](https://doi.org/10.9734/arjass/2020/v12i430199)
- Makame, M., Salum, L. A., & Kangalawe, R. Y. M. (2018). Livelihood Assets and Activities in Two East Coast Communities of Zanzibar and Implications for Vulnerability to Climate Change and Non-Climate Risks. *Journal of Sustainable Development*, 11, 205. DOI: [10.5539/jsd.v11n6p205](https://doi.org/10.5539/jsd.v11n6p205)
- Mercier, S., Villeneuve, S., Mondor, M., & Uysal, I. (2017). Time-Temperature Management Along the Food Cold Chain: A Review of Recent Developments. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16 (4), 647-667. DOI: [10.1111/1541-4337.12269](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12269)
- Microtrend. (2022). Abuja, Nigeria Metro Area Population 1950-2023. Available at: <https://www.macrotrends.net/cities/21976/abuja/population#:~:text=The%20current%20metro%20area%20population,a%205.43%25%20increase%20from%202021.>
- Msetule, L., Komba, E. V. G., Kimera, S. I., & Mdegela, R. H. (2017). Contamination of frozen broiler chicken meats with antimicrobial resistant thermophilic *Campylobacter* in Morogoro, Tanzania. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(5). DOI: <https://doi.org/10.26717/bjstr.2017.01.000406>
- Mund, M. D., Khan, U. H., Tahir, U., Mustafa, B. E., & Fayyaz, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 1433 - 1446. DOI: [10.1080/10942912.2016.1212874](https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1212874)

- National Bureau of Statistics [NBS] (2023). Nigeria Gross Domestic Product Q1 2023. Available at: <https://nigerianstat.gov.ng/elibrary/read/1241325>
- National Medical Products Administration. (2007). Provisions on the Management of Food Recall (Order No. 98 of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine). Available at: <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/fgwj/bmgzh/20070827162101375.html>
- Nigerian Gross Open Data for Africa [NGDPR] (2020). Bureau of Statistics. Available at: <https://nigeria.opendataforafrica.org/data#source=National+Bureau+of+Statistics+Nigeria>.
- Niyonzima, E., Ongol, M. P., Kimonyo, A., & Sindic, M. (2015). Risk factors and control measures for bacterial contamination in the bovine meat chain: a review on Salmonella and pathogenic E. coli. *Journal of Food Research*, 4(5), 98. Available at: <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n5p98>
- Nwaiku, M. S., & Ejechi, J. (2022). Inventory management practices and organisational productivity in Nigerian manufacturing firms. *Journal of Entrepreneurship and Business*, 10(2), 1-16. DOI:10.17687/jeb.v10i2.863
- Oloso, N. O. (2020). The broiler chicken production value chain in Nigeria between needs and policy: situation analysis, action plan for development, and lessons for other developing countries. *Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 15. DOI: <https://doi.org/10.1079/pavsnr202015020>
- Olowa, P. (2021). Poultry Meat will be responsible for 14% of Nigeria's meat consumption by 2029. Micro, Small and Medium Enterprises (MSMEs) Today. Available at: <https://msmes.today.com/data-analyses/poultry-meat-will-be-responsible-for-14-of-nigerias-meat-consumption-by-2029/>
- Olutegebe, N. S., Olawoye, J., & Oyesola, O. B. (2021). Well-being of rural households around Ikere-Gorge dam in Oyo State, Nigeria. Available at: <https://scite.ai/reports/10.2478/ats-2021-0005>
- Onyedinefu, G. (2022). Why we're investing in Nasarawa, by businesses. *Business day*, May 13 2022. Available at: <https://businessday.ng/business-economy/article/why-were-investing-in-nasarawa-by-businesses/>
- Onyesi, C. (2021). NAFDAC condemns the use of copse preservatives for frozen chicken. Daily Post-publication, September 27, 2021. Available at: <https://dailypost.ng/2021/09/27/nafdac-condemns-use-of-copse-preservatives-for-frozen-chicken/>
- Owolabi, C. O., Ogunsajo, O. O., Bodunde, J. G., & Olubode, O. O. (2020). Assessment of designed landscapes and their management practices in selected capital cities in Nigeria. *Ornamental Horticulture*, 26(1), 95-108. DOI: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i1.2055>
- Pozo, V. F., & Schroeder, T. C. (2016). Evaluating the costs of meat and poultry recalls to food firms using stock returns. *Food Policy*, 59:66-77.
- Ricke, S. C. (2020). Strategies to Improve Poultry Food Safety, a Landscape Review. *Annual review of animal biosciences*. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-061220-023200>.
- Schulze, M., & Spiller, A. (2021). Co-ops 2.0: alternative retail strategies to support a sustainable transition in food retailing. *Frontiers in Sustainability*. DOI: <https://doi.org/10.3389/frsus.2021.675588>
- Souza-Monteiro, D. M., & Hooker, N. H. (2012). Food Safety and Traceability, Natural Resource Management and Policy, in Walter J. Armbruster & Ronald D. Knutson (ed.), *U.S. Programs Affecting Food and Agricultural Marketing*, edition 127. Springer, 249-271. Available at: https://ideas.repec.org/h/spr/nrmchp/978-1-4614-4930-0_10.html
- State Administration for Market Regulation [SAMR]. (2021). Administration of Market Supervision on 20 Batches of Food Sampling Unqualified Notice. Available at: http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spcjs/202105/t20210507_329238.html.
- Steven, A. B., Dong, Y., & Corsi, T. M. (2014). Global sourcing and quality recalls: An empirical study of outsourcing-supplier concentration-product recalls linkages. *Journal of Operations Management*, 32, 241-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JOM.2014.04.003>
- Teffo, L. A., & Tabit, F. T. (2020). An assessment of the food safety knowledge and attitudes of food handlers in hospitals. *BMC Public Health*, 20(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8430-5>
- The Guardian business News (2021). Poultry association warns of risk of 25 million jobs in the sector. Available at: <https://nairametrics.com/2021/10/09/poultry-association-warns-of-risk-of-25-million-jobs-in-the-sector/>
- Walley, K., Parrott, P., Custance, P. R., Meledo-Abraham, P., & Bourdin, A. (2014). A review of U.K. consumers' purchasing patterns, perceptions and decision-making factors for poultry meat. *World's Poultry Science Journal*, 70, 493 - 502. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933914000555>
- Willenberg & Mills-Gray. (2019). Freezing Meat, Poultry, Fish, Eggs & Dairy Products, University of Missouri Extension. Available at: <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/86302/gh1504.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- World Bank Data (2023). GDP growth (annual %) Nigeria World Bank national accounts data, and OECD National Accounts data files. Available at: <https://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.MKTP.KD.ZG?locations=NG>
- World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). A guide to World Food Safety Day 2023: Food standards save lives (WHO Reference Number: WHO/HEP/NFS/AFS/2023.6) [Technical document]. GlobalRegions. Available at: <https://www.globalregions.org/Home/Publications/i/item/A-guide-to-World-Food-Safety-Day-2023-food-standards-save-lives>
- Yang, R., & Tang, J. (2023). Developing Thermal Control of Salmonella in Low-Moisture Foods Using Predictive Models. *Food Safety Magazine*, August 7, 2023 edition. Available at: <https://www.food-safety.com/publications/1-food-safety-magazine>
- Yu, S., Dong, X., Sun, R., He, Z., Zhang, C., Chen, M., Hong, X., Lan, L., & Zeng, F. (2020). Effect of acupuncture and its influence on cerebral activity in patients with persistent asthma: study protocol for arandomised controlled clinical trial. *Trials*, 21(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04319-w>
- Yu, S., Dong, X., Sun, R., He, Z., Zhang, C., Chen, M., Hong, X., Lan, L., & Zeng, F. (2020). Effect of acupuncture and its influence on cerebral activity in patients with persistent asthma: study protocol for arandomised controlled clinical trial. *Trials*, 21(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04319-w>
- Zhu, J., Goraya, M. A. S., & Cai, Y. J. (2018). Retailer-consumer sustainable business environment: how consumers' perceived benefits are translated by the addition of new retail channels. *Sustainability*, 10(9), 2959. DOI: <https://doi.org/10.3390/su10092959>



On The Pros and Cons of Using Excel for Regression Analysis

Sencer Buzrul^{1,a,*}

¹*Necmettin Erbakan University, Department of Food Engineering, Meram/Konya, Türkiye*

^{*}*Corresponding author*

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 10.06.2024

Accepted : 16.07.2024

Keywords:

Curve fit

Goodness-of-fit

Spreadsheet

Software

Summary output

ABSTRACT

Excel is a useful and powerful software for simple regression analysis without any programming skills and that is why, it is widely preferred by the undergraduate students from various areas such as chemistry, biology and agriculture as well as many engineering disciplines such as chemical engineering, food engineering and bioengineering. Parameter values and coefficient of determination (R^2) can be easily obtained together with the graphical representation for those models exist in Excel such as linear and exponential models. It is also possible to visually examine the model fit and experimental data together on the same graph. For linear models (linear in parameters) Excel Add-In Data Analysis-Regression tool creates a summary output, and parameter estimates, parameter uncertainties, adjusted R^2 (R^2_{adj}) and root mean square error (RMSE) values can be found even for the models that do not exist in Excel. For nonlinear models (nonlinear in parameters) Excel Add-In Solver tool can be used to obtain parameter estimates (but not uncertainties), and R^2 , R^2_{adj} and RMSE can be calculated manually. Despite these advantages, there are some shortcomings of Excel for regression analysis. For linear models with no-intercept Excel reports the incorrect and overoptimistic R^2 and also reports incorrect and overpessimistic R^2_{adj} . Excel has also some nonlinear models such as exponential and power models in it; however, Excel computes linear parameter estimates for those nonlinear models and again optimistic R^2 is calculated. This paper aims (i) to show these inaccuracies with their reasons by using published data, (ii) how to obtain the correct results, (iii) to warn the instructors who would use Excel for regression analysis in class. Excel users (instructors, students, professionals in any field) should be aware of the pitfalls when using Excel for regression.

^a sencer.buzrul@erbakan.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0003-2272-3827>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Software programs are being used not only for data analysis but also for teaching purposes. Microsoft Excel is very popular for data collection and storage and it is the first choice for especially undergraduate students as well as instructors. Moreover, professionals working in any field and dealing with data also use Excel. This is mostly due to Excel's versatility, availability and ease of use (Serment-Moreno, 2021). It seems that Excel is one of the best software for teaching statistical analysis, graphic data presentation and data management (Rubin & Edams, 2015). Regression is a widely used technique in almost all areas such as chemistry, biology, agricultural science, biotechnology, chemical engineering, food engineering and bioengineering. Excel also provides regression analysis without any knowledge of a programming language which is very advantageous for undergraduate students as well as graduates from the aforementioned disciplines. Despite all these positive features, earlier versions of Excel were criticized by statisticians. Keeling

& Pavur (2011) compared six spreadsheet packages including Excel 2007 and 2010 and noted that Excel 2010 had significant improvement especially on the numerical accuracy of the statistical distribution tests compared to Excel 2007. Besides, Excel 2010 and Gnumeric (a spreadsheet package) performed the best out of all packages on regression datasets. Although Microsoft partially improved some aspects of Excel throughout the years (Mélard, 2014), there are still some problems in Excel especially for regression analysis.

Excel users should be aware of some false results reported by Excel in regression analysis and should know how to find the correct results. Therefore, the aim of this paper was to (i) discuss some of the positive and negative features of Excel for regression analysis, (ii) show incorrect results calculated by Excel with some examples and (iii) also show how to correct those results again by using Excel.

Some Advantages of Excel for Regression Analysis

It is possible to sketch the x - y data in Excel easily and to fit some equations (such as linear and exponential equations) to data which are available in Excel. Users can fit the model and obtain the parameter estimates as well as coefficient of determination (R^2) on the graph. However, uncertainties in parameters (standard errors or confidence intervals) and other goodness-of-fit indices such as adjusted R^2 (R^2_{adj}) and standard error of the model also known as root mean square error (RMSE) cannot be obtained by this way. This is a major disadvantage because parameter uncertainties are as important as the parameters themselves (Denton, 2000; van Boekel, 1996). Excel has a great solution for this: Data Analysis ToolPak. This Excel Add-In has several applications and regression is one of them. Users who wish to use regression application follow the path: Data > Data Analysis > Regression in Excel and enter the x and y data to obtain a "Summary Output".

The summary output provides parameter estimates, standard error, 95% upper and lower limits (by default) or 99% upper and lower limits (users should write it manually, or should write any other desired percentage), correlation coefficient between the experimental data and the fitted model (named as multiple R in the summary output), R^2 , R^2_{adj} and RMSE values. Any linear model (linear in parameters) can be analyzed this way whether the model exists in Excel or not.

Consider a simple linear regression in the form of:

$$y = a \cdot x + b \quad (1)$$

where y is the dependent variable, x is the independent variable, a (slope) and b (intercept) are the model parameters. This model (exist in Excel) can directly be fitted after the graph is sketched and this provides users to visualize or observe the straight line and data together on the graph. Then users can utilize Data Analysis > Regression tool and can enter the x (shown as Input X Range in Regression tool) and y (shown as Input Y Range in Regression tool) and have the results.

Now let us consider a quadratic polynomial:

$$y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C \quad (2)$$

Since this model also exists in Excel (users have options for higher order polynomials such as third- or fourth-order), after sketching the data users can select this model to observe the model and data together on the graph. Parameter values and R^2 are also displayed. Moreover, the model is linear in parameters and therefore linear regression (polynomial or curvilinear regression) can be used to calculate the parameter values and goodness-of-fit statistics in Excel. However, it is expected that users should calculate x^2 in the cells next to x before to use Data Analysis > Regression tool and enter not only the x values but also x^2 values for the dependent variable since there is only one space for x (shown as Input X Range in Regression tool). This is a major drawback because users need to make extra calculations which is not a limitation for other statistical software packages because they are designed solely for this purpose. Nevertheless, by doing

this, Excel will provide the summary output and all necessary information.

As a last example, let us consider Van Deemter equation:

$$y = A \cdot x + B/x + C \quad (3)$$

This model is also linear in parameters (and hence linear regression can be used) but does not exist in Excel. The model is used to define chromatography data where the dependent variable is plate height in mm and the independent variable is flow rate in mL/min (Harris, 1998). After the calculation of $1/x$ next to x , both x and $1/x$ can be entered in X, and y can be entered in Y section in regression tool and this provides the summary output. Since the model is not in Excel, to observe the model fit and data together on the same graph, users should use the parameter values given in the summary output and calculate the model estimates for each x and then add the model fit to the graph. All of those (calculations and model addition) can be done in Excel (Leylak et al., 2020); however, depending on Excel experience of the users this would take one to several minutes (3-5 min). This is another limitation of using Data Analysis ToolPak for regression analysis over other statistical software packages.

For nonlinear models (nonlinear in parameters) Data Analysis > Regression tool is useless since it is designed for linear models but Solver Add-In (Data > Solver) can be used (Brown, 2001; Kemmer & Keller, 2010; Yurdakul et al., 2020). This is an iterative procedure and initial parameter estimates should be entered by the user. Unfortunately, only the parameter estimates can be obtained, not the uncertainties by this procedure. Moreover, all goodness-of-fit statistics should be calculated by the users manually. SolverAid (De Levie, 2012) which is an Excel macro can be used to obtain the standard errors of the parameters but it seems that not too many people use this macro (van Boekel, 2022). On the other hand, statistical software packages used for nonlinear regression not only estimate the parameters but also standard error of the parameters. Some packages can even calculate the upper and lower confidence limits.

Some Examples of, and Some Problems with, the Use of Excel for Regression Analysis

Linear Models with No-Intercept

Excel can be safely used for simple linear regression [Eq.(1)] as said above. Consider the data given in Table 1. Independent variable (x) is concentration in $\mu\text{g/mL}$ and dependent variable (y) is corrected absorbance (595 nm) in AU.

The data can be sketched and a straight line can be easily fitted in Excel (Figure 1).

Table 1. Absorbance data taken from Harmer & Hill (2021)

x	y
0	0.000
40	0.189
80	0.253
120	0.385
160	0.603
200	0.680

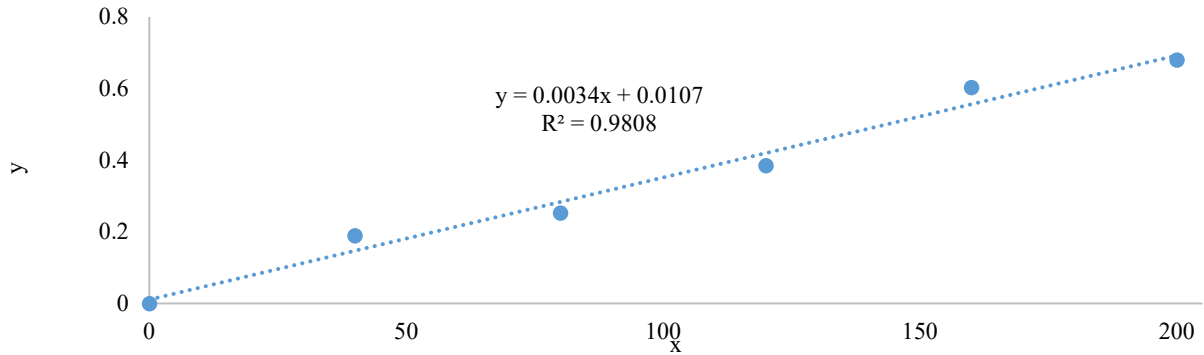


Figure 1. Fit of the linear model [Eq.(1)].

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	SUMMARY OUTPUT									
2										
3	Regression Statistics									
4	Multiple R	0.9904								
5	R Square	0.9808								
6	Adjusted R Square	0.9760								
7	Standard Error	0.0399								
8	Observations	6								
9										
10	ANOVA									
11		df	SS	MS	F	Significance F				
12	Regression	1	0.3256	0.3256	204.75	0.000138572				
13	Residual	4	0.00636	0.00159						
14	Total	5	0.33195							
15										
16		Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 99.0%	Upper 99.0%	
17	Intercept (b)	0.01067	0.02886	0.37	0.730419927	-0.069	0.091	-0.122	0.144	
18	Slope (a)	0.00341	0.000238	14.31	0.000138572	0.00275	0.00407	0.00231	0.00451	
19										

Figure 2. Summary output of the linear model [Eq.(1)] given by Excel.

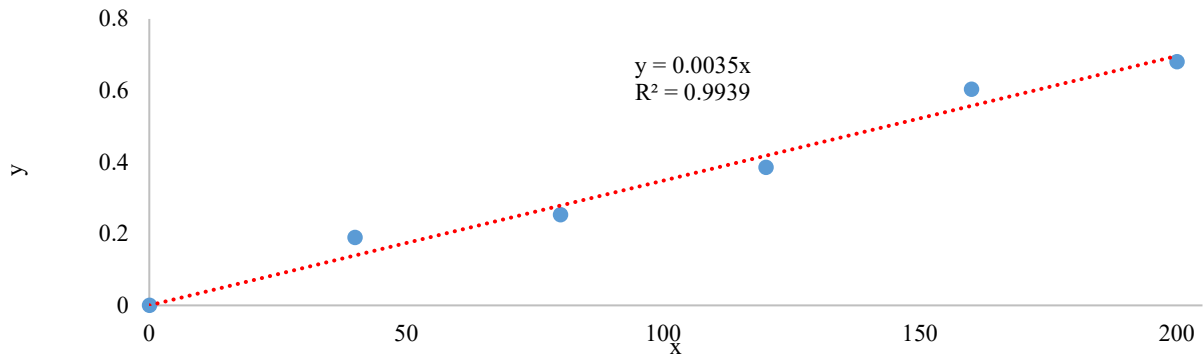


Figure 3. Fit of the linear model with no-intercept [Eq.(4)].

Parameter values as well as R^2 were found (Figure 1); however, parameter uncertainties and other goodness-of-fit indices cannot be obtained. To have those, Data Analysis > Regression in Excel was used x and y data were entered to obtain a “Summary Output”. This output is shown in Figure 2.

It was now possible to observe not only the parameter estimates but also their standard error values and their 95% and 99% lower and upper confidence limits. Moreover, R^2 (also found in Figure 1), R^2_{adj} and RMSE values were also obtained. A careful inspection of Figure 2 revealed that parameter b (intercept) was statistically insignificant ($p > 0.05$ or $p > 0.01$). Therefore, it might be better to repeat the regression without an intercept (data in Table 1 also

supported this because $x = 0 \rightarrow y = 0$). In this case Eq.(1) becomes:

$$y = a \cdot x \tag{4}$$

Again, linear trendline was added but this time intercept was set to zero (Figure 3).

Slope (a) and R^2 were displayed on the graph. Note that the model without the intercept ($y = a \cdot x$) had higher R^2 than the model with intercept ($y = a \cdot x + b$) – see Figure 1 and Figure 3. To find the parameter uncertainty and other goodness-of-fit indices “Data Analysis > Regression” application was used once more (this time “Constant is Zero” option was selected.) and the summary output was obtained (Figure 4).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	SUMMARY OUTPUT									
2										
3	Regression Statistics									
4	Multiple R	0.9969								
5	R Square	0.9939								
6	Adjusted R Square	0.7939								
7	Standard Error	0.0363								
8	Observations	6								
9										
10	ANOVA									
11		<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>				
12	Regression	1	1.0674	1.0674	811.3618	9.04E-06				
13	Residual	5	0.0066	0.0013						
14	Total	6	1.0740							
15										
16		<i>Coefficients</i>	<i>Standard Err</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 99.0%</i>	<i>Upper 99.0%</i>	
17	Intercept	0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
18	Slope (a)	0.00348	0.00012	28.48	9.99E-07	0.00317	0.00380	0.00299	0.00398	
19										

Figure 4. Summary output of the linear model with no-intercept [Eq.(4)] given by Excel.

Table 2. Sum of squared error (SSE) and sum of squared total (SST) calculations for the linear model with no-intercept [Eq.(4)] and for the data given in Table 1

x	y	$y_{model} (0.00348 \cdot x)$	$(y - y_{model})^2$	$(y - y_{mean})^2$
0	0.000	0.0000	0.000000	0.1237
40	0.189	0.1392	0.002480	0.0265
80	0.253	0.2784	0.000645	0.0097
120	0.385	0.4176	0.001063	0.0011
160	0.603	0.5568	0.002143	0.0632
200	0.680	0.6960	0.000256	0.1078
$y_{mean} = 0.35167$			SSE: 0.006587	SST: 0.332

In the summary output given in Figure 4, the same R^2 value shown on the graph (Figure 3) was found. Users generally satisfy by these results because as said earlier higher R^2 was found [$R^2 = 0.9808$ for Eq.(1) and $R^2 = 0.9909$ for Eq.(4)] and the sole parameter in Eq.(4) was also statistically significant ($p \leq 0.05$ or $p \leq 0.01$); however, it is awkward that R^2_{adj} was much smaller than R^2 (Figure 4). Normally, R^2_{adj} is almost always smaller than R^2 but, it is expected that these two should be close to each other. Moreover, R^2 (both shown in Figure 3 and Figure 4) was rather optimistic and higher than the actual R^2 – see below.

R^2 can be calculated by using the following formula:

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (5)$$

where SSE is sum of squared error i.e., sum of the difference between the (experimental) data and the model fit and SST is the sum of squared total i.e., sum of the difference between the (experimental) data and the mean or average of the data. These values were calculated by using Excel for Eq.(2). Results of the calculations are shown in Table 2.

It was now possible to calculate R^2 by using SSE and SST in Table 2 for Eq.(4) i.e. $y = 0.00348 \cdot x$

$$R^2 = 1 - \frac{0.006587}{0.332} = 0.9802 \quad (6)$$

This R^2 value was smaller than the one reported by Excel in Figure 3 and Figure 4 which was 0.9939. A question arises here: How Excel could calculate different R^2 than the real R^2 ?

Normally SST should be calculated as:

$$SST = \sum (y - y_{mean})^2 \quad (7)$$

However, Excel for no-intercept model calculates SST as:

$$SST = \sum (y - 0)^2 \quad (8)$$

In other words, Excel sets the mean value as zero in regression through origin and this generally ends up with higher SST and hence higher R^2 – see Eq.(5). SST value calculated by using Eq.(8) was found as 1.074 which was exactly the same value in Figure 4. However, SST was found as 0.332 by using Eq.(7) (Table 2).

The formula of R^2_{adj} is given below:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - R^2) \quad (9)$$

where n is the number of data points and p is the number of parameters in the model. According to Eq.(9), R^2_{adj} and R^2 can only be equal to each other in two cases: (i) if $R^2 = 1$ then $R^2_{adj} = 1$ which means $R^2 = R^2_{adj}$. However, $R^2 = 1$ means perfect fit and this is not likely possible for any experimental data such as biological or chemical data. (ii) if there is only one parameter in the model then $R^2 = R^2_{adj}$. Other than these two cases R^2_{adj} should be smaller than R^2 .

Since Eq.(4) had only one parameter R^2 should be equal to R^2_{adj} ; however, it was totally a different value (Figure 4). Therefore, R^2_{adj} too should be calculated, but in our case, there was no need for another calculation because we already calculated and found R^2 value as 0.9802 which was also the value of R^2_{adj} .

RMSE can be calculated by using the following formula:

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{n-p}} \quad (10)$$

As said earlier there was only one parameter (p) in the model [Eq.(4)] and number of data points (n) was 6 (Table 1), and SSE was calculated as 0.006587 (Table 2). If these values were integrated into Eq.(10), RMSE can be found as 0.0363. Note that both SSE and RMSE values were same as the ones calculated by Excel (Figure 4). In conclusion, RMSE (standard error of the model) was the sole correct goodness-of-fit statistic in regression statistics table shown in Figure 4 with no-intercept model.

Now consider Eq.(2) with no-intercept, i.e.:

$$y = A \cdot x^2 + B \cdot x \quad (11)$$

If Data Analysis > Regression application of Excel is used for Eq.(11), R^2 and R^2_{adj} values would be again incorrect (RMSE would be correct) in the summary output and they should be recalculated by the user, but this time users should make two calculations: one for R^2 and one for R^2_{adj} because number of parameters in Eq.(11) is not one. Furthermore, the model should be added to the graph manually by the users to visualize the model fit and the experimental data on the same sketch.

Nonlinear Models

There are some nonlinear models such as exponential and power models in Excel; however, the trend lines of these models do not represent the best fit parameter estimates obtained from nonlinear regression. Excel linearizes these models by logarithmic transformations and computes parameter values obtained from linear regressions (Dolan & Mishra, 2013; Yurdakul et al., 2020). Moreover, R^2 value given by Excel for those models are also incorrect.

Let us give an example to show these shortcomings by using the exponential model in Excel which is in the form of:

$$y = G \cdot e^{-H \cdot x} \quad (12)$$

where y is the dependent variable, x is the independent variable, G and H are the model parameters.

As an example, consider the data given in Table 3. Original data were published by Halabi et al. (2020); however, data were directly taken from <https://github.com/TinyvanBoekel/IDJ> (van Boekel, 2022). Independent variable (x) is time in minutes and dependent variable (y) is concentration of α -lactalbumin in mg/L.

Table 3. Denaturation data of α -lactalbumin taken from van Boekel (2022)

x	y
0.0	1.288
1.1	1.214
3.1	1.088
5.1	0.969
7.1	0.844
9.1	0.769
14.1	0.596
19.1	0.389
24.1	0.279
29.1	0.295
39.1	0.135
49.1	0.122
59.1	0.066

Figure 5 shows the model fitting, model equation and R^2 computed by Excel. When Eq.(12) was fitted to the data $G = 1.2002$, $H = 0.05$ and $R^2 = 0.9926$. If the exponential model was linearized by logarithmic transformation:

$$\ln y = \ln G - H \cdot x \quad (13)$$

or

$$y' = G' - H \cdot x \quad (14)$$

where $y' = \ln y$ and $G' = \ln G$. It was possible to perform simple linear regression by using Eq.(13) or Eq.(14). Therefore, if the natural logarithm of y values given in Table 3 were calculated and then $\ln y$ vs. x was plotted, Excel reported the results given in Figure 6.

Parameter H could be directly obtained from the linear regression as 0.0505 which has the same value as exponential model's parameter H (Note that it was found as 0.05, the difference was due to the way of reporting the digits in Excel) and $\ln G = 0.1825$ which means $G = \exp(0.1825)$ or $G = 1.2002$. In brief, both models i.e., Eq.(12) and Eq.(13) resulted in the same parameter estimate. This would lead to a wrong conclusion as there was no difference between linear and nonlinear regression results. As said before Excel linearizes the nonlinear equation and obtains the parameters via linear regression (not nonlinear regression!) and computes those parameters in the nonlinear model. Therefore, parameter values given in Figure 5 are not the best-fit parameters.

In order to obtain the parameters via nonlinear regression [Eq.(12)], Solver in Excel was used. The parameter values and R^2 were found as: $G = 1.2893$, $H = 0.0572$ and $R^2 = 0.9957$. The parameter values were close but not identical and so was R^2 . Fits of both models (linear and nonlinear parameters estimates) are shown in Figure 7.

Visually results of non-linear regression were better because the orange lines passed closer to the data (blue circles) especially for the first four data points (Figure 7). Furthermore, R^2 of the nonlinear regression was higher than that of linear regression indicating a better fit, but unfortunately, there is another pitfall in exponential model: Excel reports the wrong and optimistic R^2 for its exponential model (Even if this was the case, the nonlinear regression produced better R^2 value).

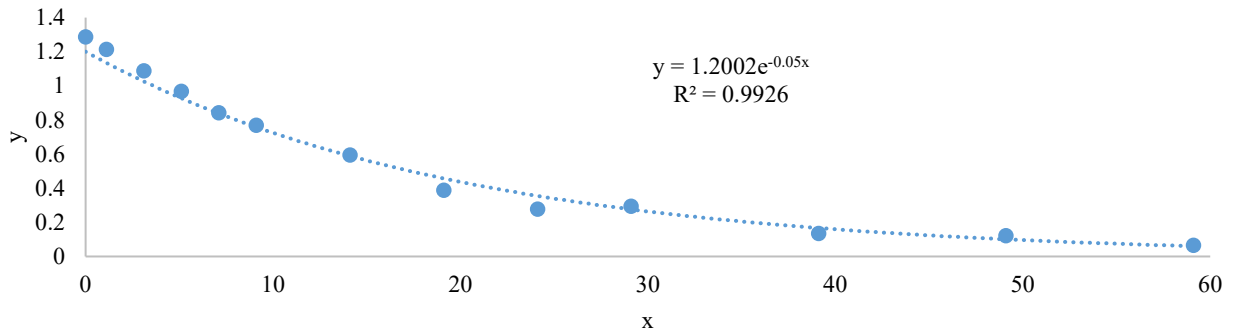


Figure 5. Fit of the exponential model [Eq.(12)].

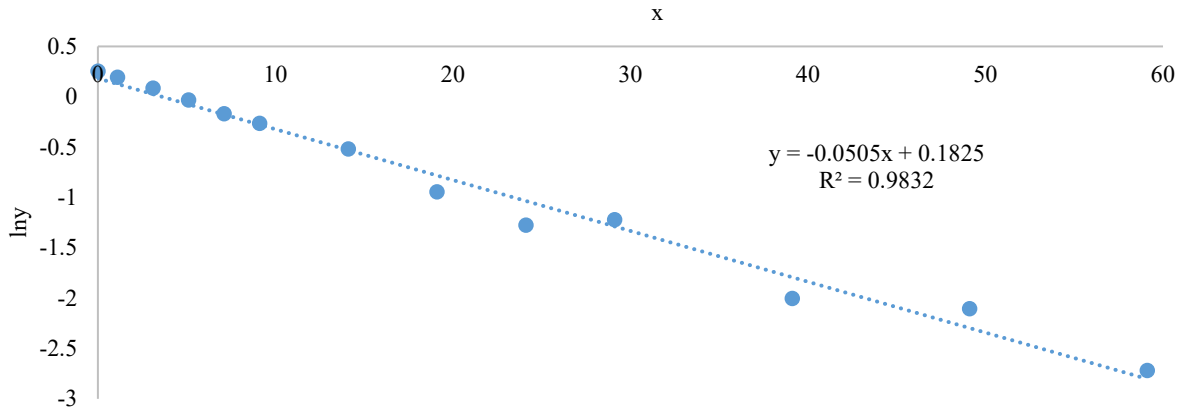


Figure 6. Fit of the linearized exponential model [Eq.(13)].

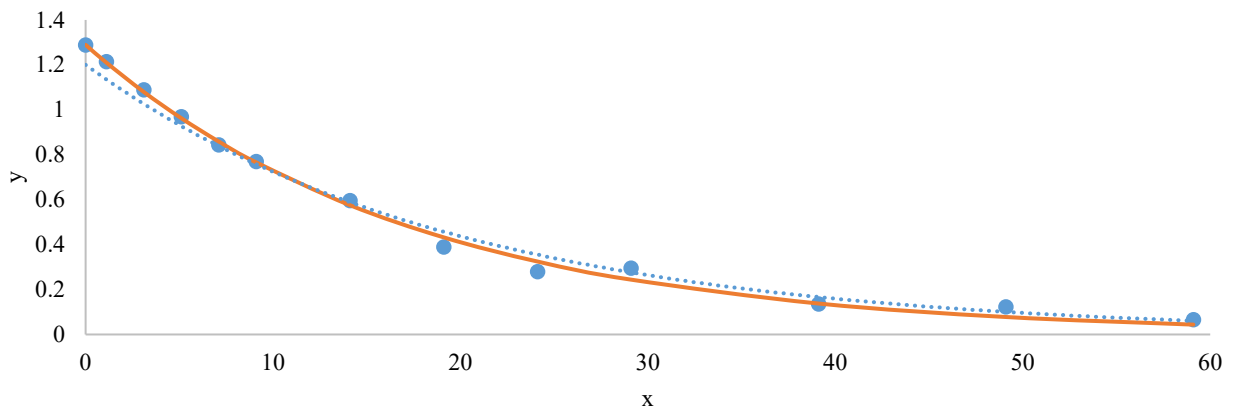


Figure 7. Fit of exponential model [Eq.(12)]. The dotted blue lines were the results of Excel by adding the trend line of exponential model (linear regression). The solid orange lines were the results of Solver Add-In of Excel (nonlinear regression).

We concluded that linear regression fit was worse than that of nonlinear regression. Nevertheless, linearization is not totally useless because parameter values obtained by linear regression can be used as the initial estimates for nonlinear regression (Buzrul, 2024; van Boekel, 2008).

It may be possible to calculate SSE and SST for Excel's exponential model ($1.2002 \cdot e^{-0.0505 \cdot x}$) and the results of these calculations are shown in Table 4.

By using the values in Table 4:

$$R^2 = 1 - \frac{0.03198}{2.2782} = 0.9860 \quad (15)$$

This R^2 value was smaller than the one reported by Excel in Figure 5 which was 0.9926. We can ask the same question once again here: How come Excel could calculate different R^2 than the real R^2 ? R^2 value reported in Excel for non-linear models was nothing but the square of (Pearson's) correlation coefficient (r). Note that this correlation was not between x and y but between y and y_{model} . Using the y and y_{model} values in Table 4 correlation coefficient (r) was calculated as 0.9953 and its square was 0.9926 which was R^2 value in Figure 5.

Table 4. Sum of squared error (SSE) and sum of squared total (SST) calculations for Excel's exponential model [Eq.(12)] and for the data given in Table 3

x	y	$y_{\text{model}} (1.2002 \cdot e^{-0.0505 \cdot x})$	$(y - y_{\text{model}})^2$	$(y - y_{\text{mean}})^2$
0.0	1.288	1.2002	0.00771	0.4468
1.1	1.214	1.1353	0.00619	0.3534
3.1	1.088	1.0263	0.00381	0.2195
5.1	0.969	0.9277	0.00171	0.1221
7.1	0.844	0.8386	0.00003	0.0504
9.1	0.769	0.7580	0.00012	0.0223
14.1	0.596	0.5889	0.00005	0.0006
19.1	0.389	0.4575	0.00469	0.0531
24.1	0.279	0.3554	0.00583	0.1160
29.1	0.295	0.2761	0.00036	0.1053
39.1	0.135	0.1666	0.00100	0.2348
49.1	0.122	0.1006	0.00046	0.2475
59.1	0.066	0.0607	0.00003	0.3064
$y_{\text{mean}} = 0.6195$			SSE: 0.03198	SST: 2.2782

It should be noted that both examples (linear model with no-intercept and nonlinear model) could be solved by using standard statistical software package without a problem. We used SigmaPlot 12.0 for both dataset and managed to obtain the correct results (not shown). However, those using Excel for such problems should be aware of these pitfalls.

Conclusion

Use of Excel for regression analysis, and some advantages and disadvantages of Excel for such analysis has been discussed. Some errors for regression analysis with the use of Excel has been also shown. Being aware of those errors are important otherwise, misjudgment such as selecting a wrong model to describe the data or finding the incorrect parameter estimates should not come as a surprise.

Examples shown in this paper revealed that for linear models with no-intercept R^2 and R^2_{adj} values should be recalculated because the incorrect values were displayed by Excel. For nonlinear models in Excel such as exponential model (or power model):

- Excel reports the linear parameter estimates of exponential model (same is also true for the power model).
- Excel calculates R^2 incorrectly and it should be recalculated for the linear parameters.
- One can find the best (real) parameter estimates as well as real R^2 value of the exponential model (or power model) by using nonlinear regression (Solver in Excel).

It is normal to expect new improvements from Microsoft to fix the problems in Excel presented here.

Declarations

Declaration of competing interest

None

Data availability

Data and examples used in this paper are available upon request from the author.

References

- Brown, A.M. (2001). A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. *Computer Methods and Programs Biomedicine*, 65, 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0169-2607\(00\)0124-3](https://doi.org/10.1016/S0169-2607(00)0124-3)
- Buzrul, S. (2024). Fen bilimleri ve mühendislik uygulamalarında deneysel verilerin matematik modellerle tanımlanması. *Excel Uygulamalı Anlatım*. Ankara, Türkiye, *Akademisyen Yayınevi*. <http://dx.doi.org/10.37609/akya.3030>
- De Levie, R. (2012). Advanced Excel for scientific data analysis. New York, NY, USA: *Oxford University Press*.
- Denton, P. (2000). Analysis of First-order kinetics using Microsoft Excel Solver. *Journal of Chemical Education*, 77, 1524-1525. <https://doi.org/10.1021/ed077p1524>
- Dolan, K.D., & Mishra, D.K. (2013). Parameter estimation in food science. *Annual Reviews in Food Science and Technology*, 4, 401-422. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101247>
- Halabi, A., Deglaire, A., Hamon, P., Bouhallab, S., Dupont, D., & Croguennec, T. (2020). Kinetics of heat-induced denaturation of proteins in model infant milk formulas as a function of whey protein composition. *Food Chemistry*, 302, 125296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125296>
- Harmer, N.J., & Hill, A.M. (2021). Unique data sets and bespoke laboratory videos: teaching and assessing of experimental methods and data analysis in a pandemic. *Journal of Chemical Education*, 98, 4094-4100. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00853>
- Harris, D.C. (1998). Nonlinear least-squares curve fitting with Microsoft Excel Solver. *Journal of Chemical Education*, 75, 119-121. <https://doi.org/10.1021/ed075p119>
- Keeling, K.B. & Pavur, R.J. (2011). Statistical accuracy of spreadsheet software. *The American Statistician* 65, 265–273. <https://doi.org/10.1198/tas.2011.09076>
- Kemmer, G., & Keller, S. (2010). Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nature Protocols*, 5, 267–281. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.182>
- Leylak, C., Yurdakul, M., & Buzrul, S. (2020). Use of Excel in food science 1: linear regression (in Turkish). *Food and Health*, 6, 186-198. <https://doi.org/10.3153/FH20020>
- Mélard, G. (2014). On the accuracy of statistical procedures in Microsoft Excel 2010. *Computational Statistics*, 29, 1095-1128. <https://doi.org/10.1007/s00180-014-0482-5>

- Rubin, S.J., & Abrams, B. (2015). Teaching fundamental skills in Microsoft Excel to first-year students in quantitative Analysis. *Journal of Chemical Education*, 92, 1840-1845. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00122>
- Serment-Moreno, V. (2021). Microbial modeling needs for the nonthermal processing of foods. *Food Engineering Reviews*, 13, 465-489. <https://dx.doi.org/10.1007/s12393-020-09263-8>
- van Boekel, M.A.J.S. (1996). Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *Journal of Food Science*, 61, 477-485, 489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb13138.x>
- van Boekel, M.A.J.S. (2008). *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. Boca Raton, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420017410>
- van Boekel, M.A.J.S. (2022). Kinetics of heat-induced changes in dairy products: Developments in data analysis and modelling techniques. *International Dairy Journal*, 126, 105187. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105187>
- Yurdakul, M., Leylak, C., & Buzrul, S. (2020). Use of Excel in food science 2: non-linear regression (in Turkish). *Food and Health*, 6, 199-212. <https://doi.org/10.3153/FH20021>



Investigation of Knowledge, Attitudes and Behaviours of University Students/Consumers About Organic Animal Products

Oğulcan Aral^{1,a,*}, Yusuf Cufadar^{2,b}

¹ORSER Kontrol ve Sertifikasyon Ltd. Şti., 06810, Ankara, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 42130, Konya, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 23.06.2024 Accepted : 01.08.2024</p> <p><i>Keywords:</i> Organic animal products Organic agriculture University students Knowledge Behavior</p>	<p>This study aims to determine the knowledge, attitudes and behaviors of university students/consumers towards organic animal products. The study included 1389 university students. The data was collected between 15 October 2023 and 15 January 2024. T-test, ANOVA and Pearson correlation test were used in the analysis. As a result of the research, it was found that university students do not have sufficient information about organic products, but they do say that they consume organic animal products. The internet, social media, family and relatives are the most important sources of information about organic livestock products for university students. In addition, it was found that students prefer milk and dairy products and red or white meat among organic animal products. It was observed that the respondents perceived organic animal products to be healthy, nutritious and safe. It was observed that they generally source these products from their home towns or from familiar producers and they perceive them as healthy, tasty and of high quality. It was found that the knowledge, attitudes and behaviors of university students towards organic animal products differed statistically significantly according to some variables. While a weak positive relationship was found between their knowledge and attitudes towards organic animal products, a positive and moderately significant relationship was found between attitudes and behaviors. The results of this study provide important information about the knowledge, attitudes and behaviors of university students towards organic animal products. It also provides a comprehensive understanding of the popularity and consumption habits of organic animal products among university students in Türkiye.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2242-2256, 2024

Üniversite Öğrencilerinin/Tüketicilerin Organik Hayvansal Ürünler Hakkındaki Bilgi, Tutum ve Davranışlarının İncelenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 23.06.2024 Kabul : 01.08.2024</p> <p><i>Anahtar Kelimeler:</i> Organik hayvansal ürün Organik tarım Üniversite öğrencileri Bilgi Davranış</p>	<p>Bu çalışma, üniversite öğrencilerinin/tüketicilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Çalışmaya 1389 üniversite öğrencisi dâhil edilmiştir. Verileri 15 Ekim 2023- 15 Ocak 2024 tarihleri arasında toplanmıştır. Analizde t testi, ANOVA ve Pearson Korelasyon testi kullanılmıştır. Araştırma sonucunda üniversite öğrencilerinin organik ürünler hakkında yeterli bilgiye sahip olmadıkları, ancak organik hayvansal ürünleri tükettiklerini belirttikleri tespit edilmiştir. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünler hakkında bilgi edinme kaynakları arasında internet, sosyal medya, aile ve akrabalar öne çıkmaktadır. Ayrıca, öğrencilerin organik hayvansal ürünler arasında süt ve süt ürünleri ile kırmızı veya beyaz eti tercih ettiği tespit edilmiştir. Bu ürünleri genellikle memleketlerinden veya tanıdık üreticilerden temin ettikleri görülmüştür. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarının bazı değişkenlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılaştığı ortaya çıkmıştır. Organik hayvansal ürünlere yönelik bilgileri ile tutumları arasında zayıf bir pozitif ilişki, tutum ile davranışları arasında ise pozitif yönde orta düzeyde anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, üniversite öğrencileri organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca, Türkiye’de üniversite öğrencileri arasındaki organik hayvansal ürünlerin popülarlığı ve tüketim alışkanlıkları hakkında kapsamlı bir anlayış sunmaktadır.</p>

^a ogulcanaral@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-1882-3449>

^c ycufadar@selcuk.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0001-9606-791X>



Giriş

Dünya nüfusunun artışı ve buna bağlı olarak tarım ürünlerine olan talebin artması besin kıtlığı yaşanabileceği endişesini doğurmuştur. Bu düşünce üreticileri ve bilim insanlarını besin biyoteknolojisi çalışmaları üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu çalışmalar sonucunda hayvanlardan daha fazla verim alabilmek için hayvancılıkta çeşitli ilaçlar, kimyasallar, yem katkı maddeleri kullanılmaya başlanmıştır. Üretim artışını sağlayan bu gelişmeler, modern tarım toplumunun genel refahını tehdit eden birçok problemi de beraberinde getirmiştir. Tarım ürünlerinde kullanılan kimyasal gübre, ilaç ve hormonlar insan sağlığını doğrudan etkilemeye, toprağın yapısını bozmaya, çevre kirliliğine ve ekolojik tahribatlara neden olmaya başlamıştır. Yaşanan bu sorunlar organik ürünlere olan talebi artırmıştır (Ayla ve Altıntaş, 2017; Eti İçli ve ark., 2016; Oğul, 2019; Sandallıoğlu, 2014). Uzun süredir insanların organik ürünlere olan ihtiyaçları birtakım girişimleri beraberinde getirmiştir. Günümüzde ise bu ihtiyaçlar çeşitlenmekte ve organik ürünlerle ilgili girişimlerdeki gelişmeler devam etmektedir.

Organik hayvansal üretim sistemleri başta Avrupa ülkeleri olmak üzere diğer gelişmiş ülkelerde de giderek yaygınlaşmakta, ancak bu sistemde ekonomik öncelikler ve hayvanların büyüme performanslarına yönelik hassasiyetler ön planda tutulmamaktadır. Hayvan haklarına yönelik çalışmalar serbest gezinme sisteminin geliştirilmesine neden olmuş, sağlıklı ürün tüketmeye yönelik talepler doğrultusunda temelinde hayvan refahı olan organik üretim sistemi ekonomik anlamda dikkat çekecek noktaya gelmiştir (İnan ve ark., 2021; Oğul, 2019). Nitekim organik üretim sisteminin kazançlarının farklı boyutlarda olduğu dikkati çekmektedir.

Organik üretimi teşvik eden unsurların başında gerek yem gerekse sağlık uygulamalarından dolayı elde edilen üründe insan sağlığını etkileyecek nitelikte kalıntının bulunmaması gerekmektedir. İnsanların sağlıklı beslenme hakkını engelleyecek her türlü faaliyet aslında önemli bir kusur olarak değerlendirilmektedir. Dünya genelinde üretim miktarları artma eğiliminde olup, bu sistemlere karşı olan talebin ilerleyen yıllarda da artacağı düşünülmektedir. Dünya genelinde artan eğitim kalitesi ve bilinç düzeyi de insanları daha sağlıklı bir yaşama yönlendirmektedir (Cantu ve ark., 2021). Özellikle son yıllarda yaşanan Covid-19 salgını da beslenme modellerinde değişikliğe yol açmış, bu salgın insanların bağımsızlığı artıran gıdalara yönelmesine neden olmuştur (Çulfa ve ark., 2021).

Dünyayı etkisine alan Covid 19 salgını sürecinde güvenilir olan organik gıdalar ile beslenme ön plana çıkmıştır. Bu durum üniversite öğrencilerinin organik ürün tüketimi hakkında ne kadar bilgili olduğu ve çevresine yaydığı sorusunu gündeme getirmiştir (Şahin Demirel ve Yercan, 2022). Bu noktadan hareketle bu konuda tüketicilerin bilinçlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bilinçlendirme çalışmalarının ilk basamağını oluşturan durum değerlendirmesinin yapılması ve sonrasında bilinçlendirmeye yönelik eğitimlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Durum değerlendirmesi kapsamında tüketicilerin önemli bir bölümünü oluşturan ve meslek yaşamına atıldıklarında çevreleri üzerinde etki paylarının yüksek olabileceği düşünülen üniversite

öğrencileri ile yapılmasının etkili olacağı değerlendirilmiştir (İnan ve ark., 2021; Oğul, 2019). Yapılan literatür taramasında üniversite öğrencilerinin organik ürünlere yönelik görüşlerini belirleyen çalışmaya rastlanmıştır (Arun ve Premaselvaraji, 2023; Ayaşan ve ark., 2020; Ayaşan ve ark., 2021a; Bauerné Gáthy ve ark., 2022; Demirbaş ve Toplu Yılmaz, 2021; Güven ve Pekmezci, 2015; Kamenidou ve ark., 2019; Kocaçal ve ark., 2022; Kumar ve Dhanalakshmi, 2018; McReynolds ve ark., 2018; Öruk, 2021; Sarıca ve ark., 2023; Svecova ve Odehnałova, 2019; Taşkın ve ark., 2020). Ancak gerek Türkiye’de ve gerekse Dünyada gerçekleştirilen ve üniversite öğrencileriyle tamamlanan çalışmaların belirli bir bölgeyle sınırlandırıldığı da dikkati çekmektedir. Bu kapsamda Türkiye’nin farklı bölgelerinde yaşayan üniversite öğrencilerinin organik ürün hakkındaki bilgilerinin belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Nitekim üniversite öğrencilerinin organik ürün konusundaki farkındalığının artırılması organik ürün pazarının oluşturulmasına ve tüketimine önemli katkılar sunabilecektir. Bu düşünceden hareketle çalışmada, üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada üniversite öğrencilerinin; organik hayvansal üretim hakkındaki genel bilgilerinin, organik hayvansal ürünleri satın alırken aradıkları özellikleri, tercih ettikleri organik hayvansal ürünleri, organik hayvansal ürünleri tercih etme nedenlerini, organik hayvansal ürün ile ilgili bilgi kaynaklarını, organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarda sosyo demografik özelliklerin farklılık yaratıp yaratmadığını, organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlar arasındaki ilişkiyi belirlemek hedeflenmektedir.

Materyal ve Yöntem

Üniversite öğrencilerinin/tüketicilerin organik hayvansal ürüne yönelik bilgi, tutum ve davranışlarında belirlenmesine yönelik düşüncelerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırmanın materyaline ve yöntemine aşağıda yer verilmiş, tekrarlardan kaçınmak için üniversite öğrencileri/tüketiciler yerine makalede üniversite öğrencileri kavramı kullanılmıştır.

Araştırmanın Materyali

Araştırmanın ana materyalini anket verileri oluşturmaktadır. Araştırmada kullanılacak ankette yer alan sorular, üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünler hakkındaki bilgi, tutum ve davranışlarını belirlemek amacıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan anket formu Google form olarak düzenlenmiş, form aracılığıyla veriler elde edilmiştir. Anket formu hazırlanırken Tarım ve Orman Bakanlığı Kayıtlarından (Anonim, 2023a), ETO Derneği (Anonim, 2022), FIBL, FAO (Food and Agriculture Organization-Gıda ve Tarım Organizasyonu) (Anonymous, 2023), Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Yükseköğretim Bilgi Yönetim Sistemi gibi kurum ve kuruluşların verilerinden (Anonim, 2023b), organik hayvansal ürün tüketim hakkındaki ulusal ve uluslararası literatürden, araştırma raporlarından ve istatistiksel verilerden yararlanılmıştır. Ulusal ve uluslararası literatür

taraması yapıldıktan sonra “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranış Anket Formu” oluşturulmuştur.

Anket Formunun kapsam geçerliğine kanıt oluşturmak için uzman görüşü alınmıştır. Uzmanların tamamının tüm soru ve maddelerin uygun olduğunu belirttikleri görülmüştür. Uzman görüşleri doğrultusunda anket Formunun kapsam geçerliği sağlanmış, pilot çalışma kapsamında anket formu 10 üniversite öğrencisine uygulanmıştır. Uygulama sonucunda üniversite öğrencilerinin anket formunda yer alan soruların ve maddelerin anlaşılır olduğunu belirttikleri görülmüştür.

Anket Formu; “Genel Bilgi Formu” “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu”, “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu” ve “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu” olmak üzere dört bölümden oluşmaktadır.

Genel Bilgi Formu: Araştırmada yer alan üniversite öğrencilerinin sosyodemografik özelliklerini belirlemek amacıyla araştırmacı tarafından geliştirilmiştir.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu; üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün bilgisini belirlemek amacıyla araştırmacı tarafından geliştirilen 21 maddeden oluşan bir formdur. Formdaki maddeler “katılıyorum (2)”, “katılmıyorum (1)” şeklinde cevaplanmaktadır.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu; üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik tutumlarını belirlemek amacıyla araştırmacı tarafından geliştirilen, 24 maddeden oluşan, beşli likert tipi formdur. Formdaki maddeler “kesinlikle katılıyorum (5)”, “katılıyorum (4)”, “kararsızım (3)”, “katılmıyorum (2)”, “kesinlikle katılmıyorum (1)” şeklinde cevaplanmaktadır.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu; üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik davranışlarını belirlemek amacıyla araştırmacı tarafından hazırlanan, 16 maddeden oluşan, beşli likert tipi formdur. Formdaki maddeler “Her Zaman (5)”, “Sık Sık (4)”, “Bazen (3)”, “Nadiren (2)”, “Hiçbir Zaman (1)”, şeklinde cevaplanmaktadır.

Anket Formunda yer alan “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu”, “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu” ve “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu” ile ilgili maddelerinin geçerliliğinin uygunluğu için Açıklayıcı Faktör Analizi (AFA) ile ortalamalar arası fark testleri yapılmıştır. Bu kapsamda Google form aracılığıyla ankete cevap veren 782 öğrencinin verileri AFA için kullanılmıştır. AFA’ya dâhil olan öğrencilerin %83,1’i kadın ve %16,9’u erkek olup %55,6’sı 20-22 yaşlarındadır. Üniversite öğrencilerinin %60,7’sinin iki- üç kardeş olduğu, %37,1’inin ilk sırada dünyaya geldiği belirlenmiştir. Üniversite öğrencilerinin %65,6’sı lisans programına devam etmekte, %62,4’ü yurttadır. Elde edilen verilerin AFA’ya uygunluğu Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) ve Bartlett Küresellik Testi ile incelenmiştir. Bu bağlamda KMO katsayısının 0,50-0,90 arasında olması ve Bartlett Küresellik Testinin de anlamlı sonuç vermesi beklenmektedir (Tavşancıl, 2002).

Anket formunda yer alan “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu”, “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu” ve “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu” ile ilgili verilerin faktörleşmeye oldukça uygun bir yapıda olduğu ve iyi düzeyde uyum

sağladığı tespit edilmiştir. Yapılan planlama tek faktör üzerinden yapılması nedeniyle döndürme tekniklerine ihtiyaç duyulmamıştır.

Anket formlarının geçerlilikleri için yapılanlar AFA sonuçları doğrultusunda Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formundan 12 madde ve Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formundan bir madde benzerlik göstermesi ya da faktör yükünün .30 altında olması sebebiyle çıkarılmıştır. Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formundaki maddelerin faktör yüklerinin .30’un üstünde olması sebebiyle madde çıkarılmamıştır. Anket formunda yer alan “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu”, “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu” ve “Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu” ile ilgili faktör yükleri .317-.869 arasında değişmektedir.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formu ile ilgili yapılan AFA sonrasında maddelerden 12 madde çıkarılmış, form 9 maddeye indirgenmiştir. Formdaki bilgi maddelerinden en düşük 9, en yüksek 18 puan alınmakta, yüksek puan bilginin yüksek olduğunu göstermektedir.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formu ile ilgili yapılan AFA sonrasında maddelerden 16 numaralı madde çıkarılmış, form 23 maddeye indirgenmiştir. Formdaki tutum maddelerinden en düşük 23, en yüksek 115 puan alınmaktadır. Alınan yüksek puan tutumun olumlu olduğunu göstermektedir.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formu ile ilgili yapılan AFA sonrasında 16 maddeden oluşan formdan hiçbir madde çıkarılmamıştır. Formda *davranış* maddelerinden en düşük 16, en yüksek 80 puan alınmaktadır. Alınan yüksek puan davranışın olumlu olduğunu göstermektedir.

Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Bilgi Formunun AFA örnekleme üzerindeki iç tutarlılık katsayısı (α): .683; Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Tutum Formunun AFA örnekleme üzerindeki iç tutarlılık katsayısı (α): .786 ve Organik Hayvansal Ürünler Yönelik Davranış Formunun AFA örnekleme üzerindeki iç tutarlılık katsayısı (α): .944 olarak elde edilmiştir. İlgili alan yazın incelendiğinde George ve Mallery (2010) Cronbach Alfa değerinin .60’ın üstünün kabul edilebilir olduğunu ifade etmiştir. Bu bağlamda anketlerin geçerli ve güvenilir olduğu söylenebilir.

Araştırmanın Yöntemi

Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünler hakkında bilgi, tutum ve davranışlarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın verileri nicel yöntemlerden tarama modeli kullanılarak toplanmıştır. Tarama modeli, genel olarak var olan durumu ya da gerçekliği olduğu gibi araştırıp açıklamayı hedefleyen bir yaklaşım olup herhangi bir konu hakkında bilgileri toplamak amacıyla geniş bir örneklem grubuyla gerçekleştirilen çalışma olarak tanımlanmaktadır (Büyüköztürk ve ark., 2016).

Araştırmanın ana kütlesini Türkiye’de üniversite eğitimi alan çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen öğrenciler oluşturmaktadır. Farklı profilden öğrencilere ulaşabilmek için araştırmanın Türkiye genelinde yapılması hedeflenmiş, bu nedenle Türkiye genelinden veriler toplanmıştır. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması için çalışmalara başlanmış, Saunders ve arkadaşlarının (2007) geliştirdikleri örneklem büyüklüğünü hesaplama çizelgesi

ve formülü kullanılmıştır. Örnek büyüklüğü 1 000 000 ve üstü olması nedeniyle %95 güven aralığında, %5 hata payı ile üniversite öğrencilerini temsil etmesi amacıyla toplam 384 gönüllü üniversite öğrencisi belirlenerek örneklem sayısı belirlenmiştir.

Örneklem büyüklüğü belirlendikten sonra Türkiye’de bulunan devlet ve vakıf üniversitelerinde görev yapan öğretim elemanları ile iletişime geçilmiş, çalışma hakkında bilgi verilmiş, anket formunu öğrencileri ile paylaşmaları istenmiştir. Çalışmaya katılmayı isteyen ve anket formunu kendi isteği ile dolduran üniversite öğrencileri ile çalışma yürütülmüştür. Google form aracılığıyla toplanan anketleri inceleyen, çalışmayı kabul eden, ankette yer alan soruların tamamına cevap veren 1389 üniversite öğrencisi çalışmanın örnekleme dâhil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen üniversite öğrencilerinin %84,6’sının kadın %56,3’ünün 20-22 yaşında olduğu, %65,7’si lisans programına devam ettiği, %64,5’i yurttan kaldığı belirlenmiştir.

Araştırmada verilerin toplanması için gereken etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bilimsel Etik Değerlendirme Kurul Başkanlığından 21.08.2023 tarihinde 573405 karar numarası ile alınmıştır. Etik kurul izinlerinin alınmasından sonra üniversitelerde görev yapan öğretim elemanları ile temasa geçilmiş, araştırmanın amacı hakkında bilgi verilmiş ve anketi öğrenciler ile paylaşmaları istenmiştir. Bu aşamadan sonra öğrencilerden gönüllü onam formları alınmış ve çalışmaya katılmaya gönüllü olan öğrenciler “Google Form” aracılığıyla “Organik Hayvansal Ürünlere Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranış Anket Formunu” cevaplamışlardır.

Çalışmanın verileri 15 Ekim 2023- 15 Ocak 2024 tarihleri arasında elektronik ortamda çevrimiçi anketlerle toplanmıştır.

Verilerin Analizi

Araştırmada kullanılan ankete verilen cevaplar değerlendirilerek sayı ve yüzdeler halinde sunulmuştur. Organik Hayvansal Ürünlere Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranış formlarının örneklem grubu için yapılan güvenilirlik bulguları incelendiğinde Cronbach Alfa güvenilirliğinin 0,730- 0,946 arasında olduğu belirlenmiştir. Anketlerin güvenilirlik değerlerinin .70 üstünde olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda örneklem grubu (1389 üniversite öğrencisi) için anketlerin güvenilir olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada “Organik Hayvansal Ürünlere Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranış Anket Formu” kullanılarak elde edilen verilerin analizinde; örneklem sayısının büyüklüğü göz önüne alınarak parametrik testlerden yararlanılmıştır. İki bağımsız değişkenin olduğu durumlarda t testi, ikiden fazla değişkenin olduğu durumda ANOVA yapılmıştır. Anlamli farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Post-Hoc testlerinden Bonferroni Testi kullanılmıştır. Organik Hayvansal Ürünlere Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranış formlarından elde edilen ortalamalar arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Testi ile incelenmiştir.

Tüm analizler için yanılma düzeyi olarak 0.05 seçilmiştir. Bu değerden büyük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı değil, küçük ya da eşit p değerleri ise anlamlı şekilde yorumlanmıştır. Toplanan verilerin analizi SPSS istatistik paket programıyla yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar iki bölümde sunulmuştur. Birinci bölümde üniversite öğrencilerinin organik ürün ve organik hayvansal ürünler hakkındaki sorulara vermiş oldukları cevaplara ait sonuçlar verilmiştir. İkinci bölümde üniversite öğrencilerinin sosyodemografik özelliklerine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarının farklılık olup olmadığına ilişkin sonuçlar sunulmuştur.

Organik Ürün ve Organik Hayvansal Ürün Tüketimine Yönelik Sonuçlar ve Tartışma

Bu bölümde üniversite öğrencilerinin organik ürün ve organik hayvansal ürün tüketimi ile ilgili sorulara vermiş oldukları cevaplara ait sonuçlar verilmiştir. Üniversite öğrencilerinin organik ürün hakkındaki bilgilerine yönelik betimsel istatistikler Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik ürün hakkında %29,4’ünün bilgisi olduğu, %63,2’sinin biraz bilgisinin olduğu, %7,3’ünün bilgisi olmadığı; organik ürün sertifikasını %42,3’ünün kontrol etmediği, %27,9’unun kontrol ettiği, %29,7’sinin ise sertifikanın kontrol edileceğini bilmediği; %59,8’inin organik hayvansal ürün tükettiği, %38,4’ünün ise organik hayvansal ürünleri ara sıra tükettiği; organik hayvansal ürünler hakkında bilgiyi %41,5’inin internet ve sosyal medyadan, %41,9’unun aile ve akrabalarından, %16,6’sının üniversite ve bölümdeki arkadaşlarından öğrendiği belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda üniversite öğrencilerinin organik ürünler hakkında biraz bilgisinin olduğu ve organik ürün alırken sertifikasını kontrol etmedikleri belirlenmiştir. Her ne kadar yapılan çalışmalar ve organik hayvansal ürünlere yönelik gerçekleştirilen çalışmalar olsa da henüz toplumda bilinç seviyesinin bu ilerlemelere paralel olmadığı görülmektedir. Toplumdaki bireylerin genel anlamda organik ürünleri köyde yetişen ürünlerle karşılaştırdıkları, köyde yetişen ürünleri organik olarak değerlendirdikleri görülmektedir (Bahşi ve Akça, 2019; Kadirhanogulları ve ark., 2022; Varoğlu ve Turhan, 2016). Her aşaması kontrollü bir şekilde yapılan ve sertifikalı olan organik ürünlerin tüketiciler tarafından tam olarak bilinmediği görülmektedir. Bu kapsamda organik hayvansal ürünlerin satın alınması ve tüketilmesi konusunda daha fazla bilgi ve anlayış gerekmektedir. Organik ürünler genellikle konvansiyonel ürünlerle karıştırılmakta, bu da organik hayvansal üründe çok önemli olan sertifika bilgisinin gerekli olmadığı yönünde bir anlayışa neden olabilmektedir (Sezgin ve Uzundumlu, 2019). Nitekim yapılan araştırmalarda da tüketicilerin organik hayvansal ürün bilgisi ile sertifika bilgisinin yeterli olmadığı yönünde sonuçlara ulaşılmıştır (Manuelian ve ark., 2020; Şahin Demirel ve Yercan, 2022; Varoğlu ve Turhan, 2016).

Üniversite öğrencilerinin organik ürün tüketim sıklıklarına yönelik betimsel istatistikler Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlerden %35,9’unun süt ve süt ürünleri, %31,1’inin kırmızı veya beyaz et, %31,6’sının yumurta, %1,4’ünün bal vb. ürünler tükettikleri/kullandıkları belirlenmiştir.

Çizelge 1. Üniversite öğrencilerinin organik ürün hakkındaki bilgileri, organik ürün sertifikasını kontrol etme durumu, organik hayvansal ürün tüketimi, bilgi kaynağı ve satın alma durumu (n= 1389)

Table 1. University students' knowledge about organic products, status of checking organic product certificate, consumption of organic animal products, source of information and purchasing status

Özellikler	n	%	Özellikler	n	%
Org. Ürün Hakkında Bilgi			Org. Ürün Sertifika Kontrolü		
Bilgisi Var	409	29,4	Evet	388	27,9
Biraz Bilgisi Var	878	63,2	Hayır	588	42,3
Bilgisi yok	102	7,3	Bilmiyorum	413	29,7
Org. Hay. Ürün Tüketimi			Org. Hay. Ürün Bilgi Kaynağı		
Evet	831	59,8	Aile-Akraba	582	41,9
Ara Sıra	533	38,4	Üniversite ve Böl. Arkadaşlar	230	16,6
Hayır	25	1,8	İnternet-Sosyal Medya	577	41,5

Çizelge 2. Üniversite öğrencilerinin tükettikleri/kullandıkları organik hayvansal ürünler

Table 2. Organic animal products consumed/used by university students

Organik hayvansal ürün	f	%
Süt ve süt ürünleri	1242	35,9
Kırmızı veya beyaz et	1077	31,1
Yumurta	1091	31,6
Diğer (bal, vb.)	48	1,4
Toplam (Birden fazla işaretleme var)	3458	100,0

Çizelge 3. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünleri tercih etme nedenleri

Table 3. Reasons why university students prefer organic animal products

Tercih nedeni	f	%
Fiyatı	68	2,0
Besin değeri	897	25,8
Güvenli olması	793	22,8
Sağlığa yararlı olması	1196	34,4
Doğa dostu olması	483	13,9
Diğer (Bilmiyorum)	40	1,1
Toplam (Birden fazla işaretleme var)	3477	100,0

Araştırmada, üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün tükettikleri, bu ürünlere yönelik bilgileri, aile ve akrabalarından edindikleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda ulaşılan bulgulara benzer şekilde organik ürün tüketiminin toplumda görece fazla olduğu (Güven ve Pekmezci, 2015; İnci ve ark., 2017; Karabaş ve Gürler, 2012; Şahin ve Demirel Yercan, 2022), özellikle aile sisteminde daha fazla bu ürünlerin tercih edildiği (Aydoğdu ve ark., 2018; Iqbal, 2015; Şahin ve Demirel Yercan, 2022) ve sonuçta da organik hayvansal ürün tüketiminin fazla olduğuna (Ayaşan ve ark., 2020; Eti İçli ve ark., 2016; Hughner ve ark., 2007; İnci ve ark., 2017; İnan ve ark., 2021; Mulder ve Liu, 2017; Rana ve Paul, 2017) yönelik araştırma sonuçlarına ulaşılmıştır.

Üniversite öğrencilerinin organik ürünleri tercih etme nedenleri Çizelge 3'de verilmiştir. Çizelge 3'te de görüldüğü gibi üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünleri %34,4'ünün sağlığa yararlı olması, %25,8'inin besin değeri, %22,8'inin güvenli olması, %13,9'unun doğa dostu olması, %2'sinin fiyatı nedeniyle tükettikleri/kullandıkları saptanmıştır.

Son yıllarda gıda endüstrisindeki tüketici davranışları önemli ölçüde değişmiştir. Bu değişimde, çevresel, teknolojik, dini ve sosyal endişelerle artan tüketici farkındalığı etkili olmuştur. Organik gıda, geleneksel olarak üretilen gıdalara bir alternatif haline gelmiş ve birçok ülke, organik gıdaların sağlık ve güvenlik faydalarını vurgulayarak tüketimini teşvik etmeye başlamıştır. Organik hayvansal ürünlere yönelik özellikle son yıllarda gerçekleştirilen kamu spotları ve tanıtımları ile

organik hayvansal ürünlerin sağlık üzerindeki etkilerine yönelik bilinçlendirme çalışmaları ile ilgili sonuçlara ulaşılmış (Aertens ve ark., 2009; Huo ve ark., 2024; İnci ve ark., 2017; Rana ve Paul, 2017; Vural ve ark., 2023), bu çalışmaların sonuçlarının da üniversite öğrencilerinden organik hayvansal ürünlere yönelik sonuçlarına yansımaları söz konusu olmuştur. Bunlarla birlikte öğrencilerin organik hayvansal ürün tüketiminin içinde köyde yetiştirilen ürünlerin olduğu da düşünülmektedir. Bahşi ve Akça (2019) yaptıkları araştırmada, katılımcıların köyde yetişen ürünleri doğal ve organik olduğu düşüncesiyle satın aldıkları belirlenmiştir. Genel olarak tüketicilerin organik ürünleri köyde yetişen ürünlerle karıştırdıkları, köyde yetişen ürünleri organik olarak değerlendirdikleri görülmektedir (Bahşi ve Akça, 2019; Kadirhanoğulları ve ark., 2022; Varoğlu ve Turhan, 2016). Bilginin aile ve akrabadan edinilmiş olması ise bir bakıma bu davranışların çok erken zamandan itibaren yerleştiğinin (Yıldırım ve ark., 2011) bir göstergesi olabilir. Nitekim özellikle beslenme alışkanlıklarında gerçekleşen ve içselleştirilen davranışlar bireyi tüm hayatı boyunca etkileme potansiyelini de beraberinde getirebilmektedir (Banwell ve ark., 2010; Mizia ve ark., 2021). Bu kapsamda üniversite öğrencilerinin ailesinde ya da akrabalarında gördükleri ya da bu kaynaklardan edindikleri organik hayvansal ürün tüketimlerine yönelik bilgilendirmeler (Aertens ve ark., 2011; Vargas-Bello-Pérez ve ark., 2022) onların beslenme tercihlerini etkilemekle kalmayıp haftada iki ya da üç gün bu ürünleri tüketmelerine de (Yiridoe ve ark., 2005) neden olabilecektir.

Üniversite öğrencilerinin organik ürünlere ulaşma yöntemlerine yönelik betimsel değerler Çizelge 4’de verilmiştir. Çizelge 4 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin/tüketicilerin organik hayvansal ürünlere %26,5’inin memlekette, %17,4’ünün tanıdık üreticilerden, %15’inin yöresel ürün pazarından, %13’ünün semt pazarından, %12,7’sinin ailenin üretim yerinden, %11,4’ünün alışveriş merkezinden %3,6’sının internette %0,4’ünün yurtdışından ulaştıkları saptanmıştır. Araştırmada elde edilen bir diğer bulgu, üniversite öğrencilerinin en fazla organik hayvansal ürün olarak süt ve süt ürünlerini tükettikleri, sağlıklı olmasının tüketim alışkanlıklarında etkili olduğu ve bu ürünleri memleketinden temin ettikleri belirlenmiştir. Bu sonuç üniversite öğrencilerinin memleketlerinden elde ettikleri ürünleri, organik ürün olarak değerlendirdiklerini göstermektedir. Öğrencilerin memlekette elde edilen ürünleri organik olarak değerlendirmeleri bu konudaki bilgi eksikliğinin de bir göstergesi olabilir. Varoğlu ve Turhan (2016) yaptıkları çalışmada da tüketicilerin önemli bir kısmının organik ürün olmayan köy ürünlerini organik ürün olarak adlandırdıklarını belirlemişlerdir. Elde edilen bu sonuçları organik hayvansal ürün piyasasına ve aynı zamanda tüketicilerin organik hayvansal ürüne yönelik bilgilerindeki yetersizliğe bağlamak mümkündür. Türkiye’de özellikle kırsal kesimde iş ve gelir kapısı olarak hayvancılık ve bu hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu kapsamda Türkiye’de süt ürünlerine yönelik geniş bir pazarın olması (Kart ve Demircan, 2014; Turan ve ark., 2017) organik süt ve süt ürünlerinin de daha fazla olmasına katkı sağlamış olabilir. Bu durum da üniversite öğrencilerinin organik süt ve süt ürünlerine ulaşmasını kolaylaştırabilir. Araştırmada organik hayvansal ürünlerin memlekette temin edilmesinde; memlekette yer alan üreticilerinden elde edilen ürünlerin daha güvenilir olmasının ya da uygun fiyatlarla temin edilmesinin etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak memlekette elde edilen ürünlerin organik olup olmadığı konusunda farklı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Organik ürün piyasasında yaşanan sorunlar nedeniyle tüketiciler organik ürün olarak değerlendirdikleri ürünleri güven duydukları memleketlerindeki üreticilerden temin etmelerine neden olmaktadır. Bu durum da en iyi tercihin güvendikleri memleketlerindeki üreticiler olduğu vurgulanmaktadır (Gracia ve De Magistris, 2008; Hughner ve ark., 2007; Liu ve ark., 2023; Tölu ve ark., 2020; Ustaahmetoğlu ve Toklu, 2015). Aynı zamanda üniversite öğrencilerinin organik ürün olarak değerlendirdikleri

ürünleri memleketlerindeki üreticilerden temin etmelerinde fiyatında etkili olabileceği düşünülmektedir. Araştırmaya dâhil edilen üniversite öğrencileri de organik hayvansal ürünlerin fiyatlarının yüksek olması nedeniyle satın almada zorlandıklarını belirtmişlerdir. Literatürde de organik hayvansal ürünlerin fiyatlarının yüksek olduğu belirtilmektedir (Eti İçli ve ark., 2016; Kamboj ve ark., 2023). Yapılan çalışmalarda da tüketicilerin organik hayvansal ürünlerin fiyatlarını yüksek olarak değerlendirdikleri (Hoogenboom ve ark., 2008; Konca ve ark., 2010; Manuelian ve ark., 2020; Tölu ve ark., 2020) görülmektedir. Ancak üniversite öğrencileri her ne kadar organik hayvansal ürünlerin pahalı olduğunu ifade etseler de daha sağlıklı olduklarını da belirtmektedirler. Organik hayvansal ürünler içeriği ve yetiştirilmesi açısından oldukça zengin besin türleri arasında yer almakta, sağlık için oldukça önemli olan mineralleri bünyesinde barındırmaktadır (Dangour ve ark., 2009; Eti İçli ve ark., 2016; Tölu ve ark., 2020). Bu durum özellikle, Covid-19 pandemisinde de görüldüğü gibi organik hayvansal ürünlerin daha sağlıklı olduğu ve tüketilmesi gerektiği inancını da beraberinde getirmiş (Şahin Demirel ve Yercan, 2022), bu durum araştırma sonuçlarına da yansımıştır. Yapılan araştırmalarda araştırma sonuçlarımıza benzer şekilde organik hayvansal ürün tüketiminde süt ve süt ürünlerinin tercih edilmesi (Can, 2023; Migliore ve ark., 2018; Średnicka-Tober ve ark., 2016), organik hayvansal ürünlerin pahalı (Ayaşan ve ark., 2020; Ayaşan ve ark., 2021a; Öruk, 2021) ancak sağlıklı bulunması (Ayaşan ve ark., 2021a; Sevinç ve ark., 2021; Toplu Yılmaz ve Demirbaş, 2021) ve genellikle güvenilen yerlerden alınmaya yönelik tercihler (Ayaşan ve ark., 2021b) araştırma sonucunu desteklemektedir.

Organik Hayvansal Ürünlere Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranışlara İlişkin Sonuçlar ve Tartışma

Bu bölümde; üniversite öğrencilerinin cinsiyetlerine, yaşlarına, devam ettikleri program türlerine, kaldıkları yerlere, organik ürünler hakkındaki bilgilerine, organik ürün sertifikasına bakma durumuna, organik hayvansal ürün tüketimine, organik hayvansal ürün hakkında bilgi kaynaklarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar arasında farklılık olup olmadığına ilişkin sonuçlar ile üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışları arasındaki ilişkiye ait sonuçlar sunulmuştur. Çizelge 5’te üniversite öğrencilerinin cinsiyetler ile organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait bağımsız örneklem t testi verilmiştir.

Çizelge 4. Üniversite öğrencilerinin/tüketicilerinin organik hayvansal ürünlere ulaşma yollarına ait dağılımlar

Table 4. Distribution of ways university students/consumers access organic animal products

Organik Ürüne Ulaşma Yolları	f	%
İnternet	119	3,6
Semt pazarı	433	13,0
Yöresel ürün pazarı	499	15,0
Alışveriş merkezi	381	11,4
Yurtdışı	13	0,4
Memleket	882	26,5
Tanıdık üreticiler	581	17,4
Ailenin üretim yeri	423	12,7
Toplam (Birden fazla işaretleme var)	3331	100,0

Çizelge 5. Üniversite öğrencilerinin cinsiyetlerine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve t Testi sonuçları (n=1389)

Table 5. Means and t-test results of university students' knowledge, attitudes and behaviours towards organic animal products according to their gender

Formlar	Cinsiyet	n	Ort.	ss	t	p	E. Büy.
Bilgi	Kadın	1176	17,68	0,92	1,90	0,00*	0,05
	Erkek	213	17,55	1,13			
Tutum	Erkek	1176	103,71	11,99	-1,28	0,20	
	Kadın	213	104,84	11,14			
Davranış	Kadın	1176	49,83	14,56	-3,28	0,00*	0,08
	Erkek	213	53,44	15,83			

*p<0,05, sd=1387

Çizelge 6. Üniversite öğrencilerinin yaşlarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 6. Averages and ANOVA Results of University Students' Knowledge, Attitudes and Behaviours Towards Organic Animal Products According to Their Ages

Formlar	Yaş	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	23 yaş ve üstü ¹	265	17,61	0,97	0,49	0,61		
	20-22 yaş ²	782	17,67	1,01				
	19 yaş ve altı ³	342	17,68	0,79				
Tutum	23 yaş ve üstü ¹	265	106,91	9,29	10,86	0,00*	1>2,3	0,14
	20-22 yaş ²	782	103,22	11,89				
	19 yaş ve altı ³	342	103,05	11,89				
Davranış	23 yaş ve üstü ¹	265	55,47	14,20	20,46	0,00*	1>2,3	0,17
	20-22 yaş ²	782	49,52	14,96				
	19 yaş ve altı ³	342	50,39	14,81				

*p<0,05, sd=2-1386 ¹23 yaş ve üstü, ²20-22 yaş, ³19 yaş ve altı

Çizelge 5 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik tutumlarının cinsiyete göre istatistiksel olarak ayrılmadığı (p>0,05), bilgilerinin (t=1,905; p<0,05) ve davranışlarının (t=-3,282; p<0,05) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaştığı bulunmuştur. Kadınların organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi ortalamaları (17,68) erkeklere (17,55) göre yüksek bulunurken, erkeklerin ise organik hayvansal ürünlere yönelik davranış ortalamaları (53,44) kadınlara (49,84) göre daha yüksek bulunmuştur. Organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinin etki büyüklüğünün orta (0,05), davranışlarının etki büyüklüğünün ise yüksek (0,08) olduğu belirlenmiştir. Kadınların organik hayvansal ürün bilgisinin daha yüksek olduğu, erkeklerin ise organik hayvansal ürünlere yönelik daha olumlu davranış gösterdikleri söylenebilir.

Araştırmada kadın üniversite öğrencilerinin hayvansal ürün bilgisinin erkeklere oranla yüksek olduğu, erkeklerin ise organik hayvansal ürünlere yönelik daha olumlu tutum sergiledikleri sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bu bulgunun kadın ve erkek beslenme biçimleri ve bilgi düzeylerine göre açıklamak mümkündür. Genelde Türk toplumunda kadınlara evde sağlıklı beslenme alışkanlıklarını devam ettirme rol ve sorumlulukları verilmektedir. Bu bağlamda kadınlar hem eş hem de anne görevini üstlenmektedir. Bu nedenle kadınlar sağlıklı ve yararlı ürünler elde etmek için genelde tüm besinlerin besin öğelerine ve katkılarına dikkat etmektedir (Çakır ve Coşkuntürk, 2022; Gül ve Dikmen, 2018). Bunlar da kadınların organik ürünler hakkındaki bilgilerine katkı sağlamaktadır. Cinsiyete göre organik ürün bilgi ve tutumunda değişiklik olup olmadığını belirleyen araştırma sonuçları incelendiğinde, kadınların organik hayvansal

ürünlere yönelik daha fazla bilgi düzeyine sahip olduğuna yönelik sonuçlara ulaşılmıştır (Aydoğdu ve ark., 2018; Çelik, 2013; Eti, 2017). Ancak her ne kadar durum bu yönde olsa da kadınların bilgilerini bazen davranış ve tutuma yansıtamadığı vurgulanmaktadır. Böyle bir durum sonucunda ise kadınların organik ürünlere yönelik tutumlarının olumlu olmadığı belirlenmiştir (Hassan ve ark., 2016; Kızılaslan ve Kızılaslan, 2008). Üniversite öğrencilerinin yaşlarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlara ait ANOVA ve Bonferroni test sonuçları Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6'da da görüldüğü gibi üniversite öğrencilerinin yaşlarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinde anlamlı bir farklılık olmadığı (p>0,05), tutum ve davranışlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) ve etki büyüklüğünün de yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamlı farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için yapılan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; 23 yaş ve üstü olan üniversite öğrencilerinin genel tutum (106,91) ve davranışa (55,47) yönelik ortalamaların 22 yaş ve altı olan üniversite öğrencilerinin ortalama puanlarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bir başka ifadeyle 23 yaş ve üstü olan üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik tutum ve davranışlarının daha olumlu olduğu belirlenmiştir.

Araştırmadan elde edilen bir diğer sonuç ise 23 yaş ve üzerinde olan üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürüne yönelik tutum ve davranışlarında daha olumlu özellikler gösterdikleri, lisansüstü öğrencilerinin de organik hayvansal ürünlere yönelik daha olumlu bir bakış açısına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durum yaşın ve eğitim düzeyinin artmasıyla birlikte bilgi düzeyinin de

arttığını göstermektedir. Bilindiği gibi organik hayvansal ürünler, konvansiyonel ürünlerden gerek üretim gerekse içerik olarak oldukça farklı özelliklere sahiptir. Ancak bireylerin konu hakkındaki bilgileri, bu bilgileri kabul etmeleri, kullanmaları ve içselleştirmeleri buna yönelik bir tutum oluşturabilmeleri açısından bir yaşanmışlık gerektirmektedir (Cena ve Calder, 2020; Christiana ve Lucia, 2021; Ordovas ve Berciano, 2020). Yaşı büyük bireyler ve lisansüstü öğrenciler yaşadıklarını daha iyi özümseme ve anlamlandırma açısından özel bir konuma sahiptir. Duyduklarını araştıran ve sorgulayan bireylerin, kendilerine yönelik beslenme bilinci geliştirmeleri (Govindasamy ve Italia, 1999; Magnusson ve ark., 2001; Malkoç ve ark., 2020) ve bu kapsamda da organik hayvansal ürünleri tercih etmeleri beklenmektedir. Böyle bir beklentinin ise araştırma sonuçlarına yansıdığı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda yaş ve öğrenim düzeyi yükseldikçe bireylerin organik hayvansal ürünlere yönelik tutum ve davranışlarında olumlu gelişmelerin olduğuna yönelik sonuçlar (Janssen ve Van Ittersum, 2007; Magnusson ve ark., 2001; Özden ve Özışık Yapıcı, 2021; Sezgin ve Uzundumlu, 2019; Yiridoe ve ark., 2005) ortaya konulmuştur. Üniversite öğrencilerinin devam ettikleri program türüne göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutumları Çizelge 7’de verilmiştir.

Çizelge 7’de incelendiğinde, incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünler hakkındaki bilgilerinde anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$); tutum

ve davranışlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma olduğu ($p<0,05$) ve etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamlı farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için yapılan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; lisansüstü öğrencilerinin tutum puan ortalamalarının (107,29) lisans öğrencilerinden, ön lisans (52,32) ve lisansüstü öğrencilerinin davranış boyut puan ortalamasının (56,26) lisans öğrencilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bir başka ifadeyle lisansüstü öğrencilerinin hem piyasaya, hayvana yönelik tutumlarında ve genel tutumlarında hem de davranışlarında daha olumlu özellikler göstermektedir.

Bu durumu ise tıpkı yaş değişkeninde olduğu gibi, eğitim düzeyinin yükselmesi sonucunda bilgi düzeylerinin, bilgi düzeylerinin yükselmesiyle de tutum ve davranışlarının artmasıyla açıklamanın mümkün olduğu düşünülmektedir. Üniversite öğrencilerinin kalmış oldukları yere göre organik hayvansal ürün bilgi, tutum ve davranışlarına ait ANOVA ve Bonferroni test sonuçları Çizelge 8’de verilmiştir.

Çizelge 8’de de görüldüğü gibi üniversite öğrencilerinin kaldıkları yere göre organik hayvansal ürünler hakkındaki bilgi ve davranışlarında anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$); tutumda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma olduğu ($p<0,05$) ve etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur.

Çizelge 7. Üniversite öğrencilerinin devam ettikleri program türlerine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 7. Averages and ANOVA Results of university students' knowledge, attitudes and behaviours towards organic animal products according to the types of programs they attend

Formlar	Prog. Türü	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Önlisans ¹	418	17,65	0,94	0,16	0,85		
	Lisans ²	913	17,67	0,98				
	Lisansüstü ³	58	17,62	0,70				
Tutum	Önlisans ¹	418	104,67	11,56	4,419	0,012*	3>2	0,08
	Lisans ²	913	103,30	12,13				
	Lisansüstü ³	58	107,29	8,70				
Davranış	Önlisans ¹	418	52,32	15,78	11,61	0,00*	1>2 3>2	0,13
	Lisans ²	913	49,13	14,20				
	Lisansüstü ³	58	56,26	14,24				

* $p<0,05$, $sd=2-1386$. ¹Önlisans öğrencisi, ²Lisans öğrencisi, ³Lisansüstü öğrencisi

Çizelge 8. Üniversite öğrencilerinin kaldıkları yerlere göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 8. Averages and ANOVA Results of University Students' Knowledge, Attitudes and Behaviours Towards Organic Animal Products According to Their Place of Residence

Formlar	Kal. Yer	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Aile ¹	384	17,67	0,79	0,36	0,70		
	Öğrenci evi ²	109	17,63	0,82				
	Yurt ³	896	17,65	1,03				
Tutum	Aile ¹	384	104,60	10,59	10,86	0,00*	2>1,3	0,14
	Öğrenci evi ²	109	106,21	9,68				
	Yurt ³	896	103,29	11,26				
Davranış	Aile ¹	384	51,29	15,14	1,55	0,21		
	Öğrenci evi ²	109	51,47	14,96				
	Yurt ³	896	49,87	14,64				

* $p<0,05$, $sd=2-1386$. ¹Aile yanında kalıyor, ²Öğrenci evinde kalıyor, ³Yurtta kalıyor

Anlamli farklilikin hangi gruplardan kaynaklandigini belirlemek için yapilan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; öğrenci evinde kalan öğrencilerinin tutum puan ortalamasının (106,21) yurttan kalan öğrencilerden, ayrıca öğrenci evinde kalan öğrencilerinin tutum puan ortalamasının (106,21) ailesi ile yaşayan öğrencilerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bir başka ifadeyle öğrenci evinde kalan öğrencilerin organik hayvansal ürünlere yönelik tutumlarının daha olumlu olduğu, yurttan kalan öğrencilerin ise organik hayvansal ürünlere yönelik tutumlarının ailesi ile yaşayanlara ve öğrenci evinde kalanlara göre daha olumsuz olduğu söylenebilir.

Araştırmada öğrenci evinde kalan, organik ürünler hakkındaki bilgiyi arkadaşlarından edinen üniversite öğrencilerinin organik ürünlere yönelik daha olumlu bir tutum sergiledikleri görülmektedir. Bireylerin kaldıkları yerlerde, iletişim ve etkileşimde buldukları bireylerden doğru bilgiler edinmelerinin önemli olduğu ifade edilmektedir (Grankvist ve ark., 2004; İnci ve ark., 2017). Üniversite öğrencilerinin kaldıkları öğrenci evleri bilgilerin rahatlıkla paylaşılabilirliği ve daha geniş ürün yelpazesinin sunulduğu bir ortam (Demirel ve ark., 2023; Ermiş ve ark., 2015; Gül ve Gül, 2020; Küçük, 2019) olarak değerlendirilebilir. Böyle bir ortamda organik hayvansal ürün reklamı ya da bilgilendirmeleriyle karşılaşan ve bunları araştıran bireyler bu ürünlere yönelik daha olumlu tutum sergileyebilir. Aynı zamanda üniversite öğrencilerinin bu dönemde çevrelerinde yer alan diğer akranlarından etkilenmeleri de (Kiyi ve ark., 2020; Tenenbaum ve ark., 2020) yine beklenen bir durumdur. Birbirleri ile sürekli iletişim ve etkileşim içinde bulunan bireylerin birbirlerine organik hayvansal ürün hakkında bilgileri aktarmaları, birlikte bu ürünleri deneyimlemeleri sonucunda, bu ürünlere yönelik daha olumlu bir tutum sergiledikleri (Aertsens ve ark., 2011; Hughner ve ark., 2007; Vargas-Bello-Pérez ve ark., 2022) görülmektedir. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünler hakkındaki bilgileri, tüketim durumları, organik ürünlere ulaşma yöntemlerine göre organik hayvansal ürün bilgi, tutum ve davranışlarına ait ANOVA ve Bonferroni test sonuçları Çizelge 9-12’de verilmiştir.

Çizelge 9’da görüldüğü gibi üniversite öğrencilerinin organik ürünler hakkındaki bilgilerine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinde anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$); tutum ve davranışlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0,05$) ve

etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamli farklilikin hangi gruplardan kaynaklandigini belirlemek için yapilan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; bilgisi olan üniversite öğrencilerinin tutum puan ortalamalarının (105,63) biraz bilgisi olanlardan, bilgisi olan üniversite öğrencilerinin davranışa yönelik ortalamaların (55,78) hem biraz bilgisi olanlar hem de bilgisi olmayanlardan, biraz bilgisi olan üniversite öğrencilerinin davranışa yönelik ortalaması (48,52) bilgisi olmayanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak organik ürün bilgisi olan öğrencilerinin hem tutum hem de davranış boyutunda daha olumlu özellikler gösterdikleri görülmektedir.

Çizelge 10 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik ürün sertifikasına bakma durumuna göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinde anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$); tutum ve davranışlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0,05$) ve etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamli farklilikin hangi gruplardan kaynaklandigini belirlemek için yapilan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; sertifika kontrolü yapan üniversite öğrencilerinin tutum puan ortalamalarının (105,29) sertifika kontrolü yapmayanlardan, sertifika kontrolü yapan üniversite öğrencilerinin davranışa yönelik ortalamaların (57,86) hem sertifika kontrolü yapmayanlar hem de sertifika hakkında bilgi sahibi olmayanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kısacası organik ürün sertifikasına baktığımızı belirten üniversite öğrencileri hem tutum hem de davranışta daha olumlu özellikler sergilemektedir.

Çizelge 11’de görüldüğü gibi üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün tüketimine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinde anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$); tutum ve davranışlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0,05$) ve etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamli farklilikin hangi gruplardan kaynaklandigini belirlemek için yapilan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; organik hayvansal ürün tüketen öğrencilerinin tutum (104,77) ve davranışa (52,99) yönelik ortalamaların ara sıra tüketenlerden, organik hayvansal ürün tüketen öğrencilerin davranışa yönelik ortalaması (52,99) hem ara sıra tüketenlerden hem de hiç tüketmeyenlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 9. Üniversite öğrencilerinin organik ürünler hakkındaki bilgilerine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 9. Averages and ANOVA Results of university students' knowledge, attitudes and behaviours towards organic animal products according to their knowledge about organic products

Formlar	Bilgi	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Bilgisi var ¹	409	17,71	0,77	1,08	0,34		
	Biraz var ²	878	17,65	0,99				
	Bilgisi yok ³	102	17,57	1,21				
Tutum	Bilgisi var ¹	409	105,63	11,44	6,405	0,00*	1>2	09
	Biraz var ²	878	103,10	11,71				
	Bilgisi yok ³	102	103,58	14,14				
Davranış	Bilgisi var ¹	409	55,78	14,41	43,69	0,00*	1>2, 3 2>3	0,24
	Biraz var ²	878	48,52	14,07				
	Bilgisi yok ³	102	44,87	16,63				

* $p<0,05$, $sd=2-1386$ ¹Organik ürün hakkında bilgisi var, ²Organik ürün hakkında biraz bilgisi var, ³Organik ürün hakkında bilgisi yok

Çizelge 10. Üniversite öğrencilerinin organik ürün sertifikasına bakma durumuna göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 10. Averages and ANOVA Results of university students' knowledge, attitudes and behaviours towards organic animal products according to their status of looking at organic product certificates

Formlar	Sertifika	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Evet ¹	388	17,67	0,96	0,77	0,46		
	Hayır ²	588	17,63	1,05				
	Bilmiyorum ³	413	17,71	0,78				
Tutum	Evet ¹	388	105,29	12,29	5,230	0,01*	1>3	0,08
	Hayır ²	588	103,86	11,70				
	Bilmiyorum ³	413	102,59	11,58				
Davranış	Evet ¹	388	57,86	13,93	76,52	0,00*	1>2,3	0,31
	Hayır ²	588	47,08	14,81				
	Bilmiyorum ³	413	48,08	13,06				

*p<0,05, sd=2-1386 ¹ Sertifikaya bakırım, ² Sertifikaya bakmam, ³ Bilmiyorum

Çizelge 11. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün tüketimine göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 11. Means and ANOVA Results of University Students' Knowledge, Attitude and Behaviour Towards Organic Animal Products According to Organic Animal Product Consumption

Formlar	Tüketim	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Evet ¹	831	17,71	0,81	2,69	0,07		
	Ara sıra ²	533	17,59	1,12				
	Hayır ³	25	17,60	0,95				
Tutum	Evet ¹	831	104,77	11,36	6,225	0,00*	1>2	0,09
	Ara sıra ²	533	102,65	12,05				
	Hayır ³	25	100,52	19,77				
Davranış	Evet ¹	831	52,99	14,65	33,88	0,00	1>2,3	0,22
	Ara sıra ²	533	46,65	14,01				
	Hayır ³	25	43,72	17,90				

*p<0,05, sd=2-1386 ¹ Organik ürün tüketirim, ² Ara sıra organik ürün tüketirim, ³ Organik ürün tüketmem

Çizelge 12. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün hakkında bilgi kaynaklarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışlarına ait ortalamalar ve ANOVA Sonuçları (n=1389)

Table 12. Means and ANOVA Results of university students' knowledge, attitudes and behaviours towards organic animal products according to their sources of information about organic animal products

Formlar	B. Kaynağı	n	Ort	ss	F	p	Fark	E. Büy.
Bilgi	Aile-akraba ¹	582	17,71	0,80	1,09	0,34		
	Üni. ve böl. ark. ²	230	17,62	1,13				
	İnt.-sos med ³	577	17,64	1,02				
Tutum	Aile-akraba ¹	582	103,18	12,33	3,020	0,049*	2>1	07
	Üni. ve böl. ark. ²	230	105,44	9,72				
	İnt.-sos med ³	577	103,97	12,13				
Davranış	Aile-akraba ¹	582	50,02	15,45	2,91	0,06		
	Üni. ve böl. ark. ²	230	52,53	15,51				
	İnt.-sos med ³	577	49,90	13,78				

*p<0,05, sd=2-1386 ¹ Aile-akrabalar, ² Üniversite ve bölüm arkadaşları, ³ İnternet-sosyal medya

Bir başka ifadeyle organik hayvansal ürün tükettiğini belirten üniversite öğrencilerinin hem tutum hem de davranışta daha olumlu özellikler sergiledikleri görülmektedir.

Çizelge 12 incelendiğinde üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürün hakkındaki bilgi kaynaklarına göre organik hayvansal ürünlere yönelik bilgilerinde ve davranışlarında anlamlı bir farklılık olmadığı (p>0,05); tutumlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu (p<0,05) ve etki büyüklüğünün ise yüksek olduğu bulunmuştur. Anlamlı farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için yapılan Bonferroni test sonuçları incelendiğinde; organik hayvansal ürün hakkındaki bilgileri üniversite ve bölüm arkadaşlarından

alan üniversite öğrencilerinin tutum puan ortalamalarının (105.44) ailesinden ve akrabalarından bilgi alanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bir başka ifadeyle organik hayvansal ürün hakkındaki bilgileri üniversite ve bölüm arkadaşlarından edinen üniversite öğrencilerinin tutum ve davranışta daha olumlu özellikler sergiledikleri söylenebilir.

Araştırma sonucunda organik hayvansal ürün bilgisi olan, organik hayvansal ürün alırken sertifikasına bakan, organik hayvansal ürün tükettiğini belirten ve satın alma sıklığı yüksek olan üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik tutum ve davranışlarının olumlu olduğu bulunmuştur.

Çizelge 13. Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışları arasındaki ilişkiye ait Pearson Korelasyon analizi sonuçları (n=1389)

Table 13. Results of Pearson Correlation Analysis on the Relationship between University Students' Knowledge, Attitudes and Behaviours towards Organic Animal Products

	Tutum	Davranış
Bilgi	r=0,121 p<0,05	r=0,003 p>0,05
Davranış	r=0,358 p<0,05	

İfade edilen değişkenlerin tümünün organik ürün bilgisine sahip olma ve bu bilgiyle gerçekleşen davranışların özellikleri olduğu görülmektedir. Organik hayvansal ürün tüketiminde sertifikasının olması oldukça önemlidir. Böylelikle ürünün tüm özelliklerinin kimlik kartı şeklinde sunulması ve tüketicilerin de bilgilendirilmesi sağlanmaktadır (Aertsens ve ark., 2009; Bekar ve ark., 2021; Bozyiğit ve Kılınç, 2019; Liu ve ark., 2023). Aynı zamanda organik hayvansal ürünün taşıdığı besin değerleri de sağlık açısından önemlidir (Dangour ve ark., 2009; Gürbüz ve ark., 2023; Hughner ve ark., 2007). Bu bilinç ise tüketimin artmasını beraberinde getirmektedir (Eti İçli ve ark., 2016). Elde edilen sonuçlara benzer şekilde, yapılan araştırmalarda da organik ürün bilgisine sahip tüketicilerin organik ürünleri satın alırken sertifikasını kontrol ettikleri, bu davranışın tüketim sıklığını artırdığı vurgulanmaktadır (Ayaşan ve ark., 2020; Bekar ve ark., 2021; İnci ve ark., 2017; İnan ve ark., 2021; Magnusson ve ark., 2001; Mulder ve Liu, 2017; Rana ve Paul, 2017; Turan ve Demircan, 2021). Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi, tutum ve davranışları arasındaki ilişki Çizelge 13'de verilmiştir.

Çizelge 13'de üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi ile tutum (r=0,121; p<0,05) arasında pozitif yönde anlamlı zayıf bir ilişki bulunmaktadır. Organik hayvansal ürünlere yönelik davranış ile tutum (r=0,358; p<0,05) arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi ile davranış arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

Araştırmada ulaşılan son bulgu ise organik hayvansal ürüne yönelik bilginin artması tutumu az da olsa arttırmakta, organik hayvansal ürünlere yönelik tutumun olumlu yönde olması olumlu davranışların oluşmasına katkı sağlamaktadır. Organik hayvansal ürün kavramı hem dünyada hem Türkiye'de yeni gelişmeye başlayan bir kavram olmakla beraber bilinmezlikleri de içerisinde taşımaktadır (Dalbeyler ve Işın, 2017; İnci ve Karakaya, 2021; Tıraşçı ve ark., 2020). Özellikle tüketicilerin bu konuda yeterli bilgi düzeylerinin olmaması ya da yanlış bilgilere sahip olmaları, bu ürünlere şüpheyle yaklaşılmasına neden olabilmektedir (Manuelian ve ark., 2020; Tölü ve ark., 2020). Bu şüphe ise hiç şüphesiz tutum ve davranışları etkilemektedir. Buna koşut olarak bilgi düzeyinin artması ise bu ürünlere olan talebi de arttırabilmektedir (Huo ve ark., 2024; İnci ve ark., 2017; İnan ve ark., 2021; Rana ve Paul, 2017; Vural ve ark., 2023). Ancak organik hayvansal ürünlerin fiyatlarının, konvansiyonel ürünlere göre oldukça pahalı olması, ulaşım zorluğu ya da güven eksikliği gibi nedenler tutum olumlu olsa da davranışın gerçekleşmesinde zorluklara neden olabilmektedir (Eti İçli ve ark., 2016; Hughner ve ark., 2007; Kamboj ve ark., 2023).

Sonuç ve Öneriler

Üniversite öğrencilerinin organik hayvansal ürünlere yönelik bilgi düzeyinin, tutumlarının ve davranışlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırma sonucunda, üniversite öğrencilerinin büyük bir kısmının organik ürün bilgisinin yeterli olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, organik gıdaların sağlık ve çevresel faydalarıyla ilgili bilgilendirme programları düzenlenerek bu bilgiler kamuoyuna daha etkin bir şekilde iletilebilir.

Araştırma, tüketicilerin büyük çoğunluğunun organik ürün sertifikasını kontrol etmediklerini göstermiştir. Organik hayvansal ürünlerin sertifikalı olması ve bu sertifikaların vurgulanması, tüketicilerin güvenini artırabilir. Üreticiler ve perakendeciler, sertifikaların görünürlüğünü artırmak için çaba gösterebilir.

Araştırmaya göre, üniversite öğrencileri organik ürün bilgisini genellikle internetten edinmektedirler. Bu nedenle, organik hayvansal ürünlerle ilgili güvenilir online kaynaklar daha fazla tanıtılabilir ve erişilebilir hale getirilebilir.

Araştırma, organik hayvansal ürünleri satın alırken fiyatın bir engel olabileceğini ortaya koymuştur. Organik ürünlerin fiyatlarını daha erişilebilir hale getirmek için fiyat politikaları gözden geçirilebilir ve uygun fiyatlı organik ürünlerin pazarlanması teşvik edilebilir.

Tüketiciler, organik hayvansal ürünleri genellikle sağlık, lezzet ve kalite açısından tercih etmektedir. Bu nedenle, organik ürünlerin sağlık ve lezzet odaklı pazarlaması yapılarak bu özellikler ön plana çıkarılabilir.

Araştırma sonucunda organik ürün tüketim bilgisinin kadınlarda, davranışın ise erkeklerde daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu kapsamda çok erken dönemden itibaren organik ürünün ne olduğu, satın alınırken dikkat edilmesi gerekenlere yönelik eğitimler okul öncesi ve ilköğretim döneminde uygulanabilir.

Yaş arttıkça organik ürüne yönelik davranış ve tutumun arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu kapsamda organik hayvansal ürünlerle çocukların ve gençlerin çok erken dönemden itibaren tanışması ve bunu bir alışkanlık haline getirebilmesi açısından, Milli Eğitim Bakanlığı aracılığıyla okullara belirli organik ürünler dağıtılabilir.

Son olarak, organik hayvansal ürünlere yönelik toplumun bilincinin artırılması önemlidir. Eğitim ve bilinçlendirme kampanyaları aracılığıyla, tüketicilerin organik ürünlerin çevresel ve sağlık faydaları konusunda daha fazla bilgi sahibi olmaları için toplantılar düzenlenebilir, bu konuda politikalar geliştirilebilir.

Bu önerilerin uygulanması, organik hayvansal ürünlerin tüketimini artırabilir ve tüketicilerin daha bilinçli tercihler yapmalarına yardımcı olabilir.

Beyan

Teşekkür

Araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde katkısı olan üniversitelerde görev yapan öğretim elemanları ile araştırmaya gönüllü olarak katılan ve araştırmaya katkı sunan tüm üniversite öğrencilerine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Aertsens, J., Mondelaers, K., Verbeke, W., Buysse, J., & Van Huylenbroeck, G. (2011). The influence of subjective and objective knowledge on attitude, motivations and consumption of organic food. *British Food Journal*, 113(11), 1353-1378. <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070701111179988/full/html?queryID=39%2F5407789>
- Aertsens, J., Verbeke, W., Mondelaers, K., & Van Huylenbroeck, G. (2009). Personal determinants of organic food consumption: A review. *British Food Journal*, 111(10), 1140-1167. <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070700910992961/full/html?queryID=39%2F5407789>
- Anonim (2022). *Çevresel göstergeler*. Çevre Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı, Yayın No: 54-1, <https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/organik-tarim-alanlari-ve-uretim-miktarlari-i-85837> Erişim Tarihi: 29.12.2023. ISBN: 978-625-7076-52-4
- Anonim (2023a). *2022 yılı organik tarım istatistikleri*. Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://www.tarimorman.gov.tr/konular/bitkisel-uretim/organik-tarim/istatistikler> Erişim tarihi: 03.02.2024.
- Anonim (2023b). *Yükseköğretim bilgi yönetim sistemi*. <https://istatistik.yok.gov.tr> Erişim tarihi: 03.04.2023.
- Anonymous (2023). *Definition of organic agriculture*. <https://www.ifoam.bio/why-organic/organic-land-marks/definition-organic>, Erişim tarihi: 29.12.2023.
- Arun, A., Premaselvaraji, D., Rajagopalan, S. & Nandhini, M. (2023). A study on awareness and challenges of organic products among the students with reference to Coimbatore city. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(1Ö), 4786-4797. <https://sifisheriesciences.com/journal/index.php/journal/article/view/1792/1840>
- Ayaşan T., Raflu, R. N., İnci H., & Yılmaz H. (2021a). Organic agricultural management department students perspective on organic product consumption habits. *Conference Paper Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Ştiinţifice - Seria Zootehnie*, 75,145-148. https://www.uaiasi.ro/ro/raaa/Pdf/Pdf_Vol_75/Tugay_Ayasan.pdf
- Ayaşan T., Tufan M., Çelik Ş., İnci H., Özdemirci S., & Yılmaz H. (2021b). Organik ürün tüketim alışkanlığına sına hazırlık merkezlerindeki öğrencilerin bakış açısı. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(3), 2434-2445. <https://doi.org/10.21597/jist.900396>
- Ayaşan T., Yılmaz H., İnci H., Özcan B. D., & Çuğ Z. (2020). Gıda teknolojisi bölümü öğrencilerinin organik ürün tüketim alışkanlığına dair görüşleri. *Agric. Food Environ. Anim. Sci.* 1(1), 1-13. <https://www.jafeas.com/index.php/j1/article/view/2/5>
- Aydoğdu M. H., Kaya, F., Eren, M. E., & Parlakçı Doğan, H. (2018). Organik ürün tüketim nedenleri üzerine bir araştırma: Şanlıurfa örnekleme. *Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 6(64), 161-170. <https://doi.org/10.16992/ASOS.12764>
- Ayla D., & Altıntaş D. (2017). Organik üretim ve pazarlama sorunları üzerine bir değerlendirme. *Kastamonu Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 19(4), 7-17. <https://doi.org/10.21180/kuibf.2017434551>
- Bahşi, N., & Akça, A. (2019). Tüketicilerin organik tarım ürünlerine bakış açılarının belirlenmesi üzerine bir araştırma: Osmaniye ve Şanlıurfa illeri örneği. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(1), 26-34. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.a.vi.443228>
- Banwell, C., Dixon, J., Broom, D., & Davies, A. (2010) Habits of a lifetime: Family dining patterns over the lifecourse of older Australians. *Health Sociology Review*, 19(3), 343-355. <https://doi.org/10.5172/hesr.2010.19.3.343>
- Bauerné Gáthy, A., Kovácsné Soltész, A., & Szűcs, I. (2022) Sustainable consumption-examining the environmental and health awareness of students at the University of Debrecen. *Cogent Business & Management*, 9, 1, 2105572, <https://doi.org/10.1080/23311975.2022.2105572>
- Bekar, A., Urlu, H., & İnan, R. (2021). Tüketicilerin organik gıda satın alma davranışları ve tutumlarına ilişkin bir değerlendirme. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 9(1), 220-235. <https://doi.org/10.21325/jotags.2021.786>
- Bozyiğit S., & Kılınç G. (2019). Tüketicilerin sağlıklı gıda algıları ve tüketim davranışları: Keşifsel bir çalışma. *Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 45, 201-229. <https://dergipark.org.tr/en/pub/yyusbed/issue/49191/628000>
- Büyükoztürk, Ş., Kılıç Çakmak, E., Akgün, Ö.E., Karadeniz, Ş., & Demirel, F. (2016). *Bilimsel araştırma yöntemleri*. (20. Baskı). Pegem.
- Can, B.A. (2023). Turkish consumers' perceptions of organic milk and the factors affecting consumption: The case of Kocaeli, Türkiye. *Sustainability* 15, 10044. <https://doi.org/10.3390/su151310044>
- Cantu P. A., Sheehan C. M., Sasson I., & Hayward M. D. (2021). Increasing education-based disparities in healthy life expectancy among U.S. non-hispanic whites, 2000–2010. *The Journals of Gerontology: Series B* 76(2), 319–329. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbz145>
- Cena, H., Calder, P. C. (2020). Defining a healthy diet: evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. *Nutrients*, 12(2), 334. <https://doi.org/10.3390/nu12020334>
- Christina, N. M., & Lucia, D. A. (2021). Nutrition and healthy aging: Prevention and treatment of gastrointestinal diseases. *Nutrients*, 13(12), 4337. <https://doi.org/10.3390/nu13124337>
- Çakır, Z., & Coşkuntürk, O. S. (2022). Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulunda öğrenim gören öğrencilerin sporcu beslenme bilgi düzeylerinin bazı değişkenler açısından incelenmesi. *Ulusal Spor Bilimleri Dergisi*, 6(2), 105-118. <https://doi.org/10.30769/usb.d.1210763>
- Çelik S. (2013). Kimler, neden organik gıda satın alıyor? Bir alan araştırması. *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 30, 93-108. <https://dergipark.org.tr/en/pub/susbed/issue/61808/924678>
- Çulfa S., Yıldırım E., & Bayram B. (2021). COVID-19 pandemi süresince insanlarda değişen beslenme alışkanlıkları ile obezite ilişkisi. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), 135-142. <https://doi.org/10.26453/oyjhs.798631>
- Dalbeyler, D., & Işın, F. (2017). Türkiye'de organik tarım ve geleceği. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 23(2), 215- 222. <https://doi.org/10.24181/tarekoder.364902>
- Dangour, A. D., Dodhia, S.K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., & Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: A systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 680-685. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28041>
- Demirbaş, E. & Toplu Yılmaz, Ö. (2021). Türkiye'de organik tarım ve üniversite gençliğinin organik gıda tüketim alışkanlığı üzerine bir araştırma. *Lecto Socialis*, 5(2), 99-118. <https://doi.org/10.47478/lectio.857253>
- Demirel, D. Ş., Tatar, A. M., & Demirel, R. (2023). Üniversite öğrencilerinin hayvansal protein tüketim eğilimlerinin belirlenmesi. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(Ek Sayı), 355-371. <https://doi.org/10.47495/okufbed.1220164>

- Ermış, E., Doğan, E., Erilli, N., & Satıcı, A. (2015). Üniversite öğrencilerinin beslenme alışkanlıklarının incelenmesi: Ondokuz Mayıs Üniversitesi örneği. *Spor ve Performans Araştırmaları Dergisi*, 6(1), 30-40. <https://doi.org/10.17155/spd.67561>
- Eti İçli, G., Anıl, K.N., & Kılıç, B. (2016). Tüketicilerin organik gıda satın alma tercihlerini etkileyen faktörler. *Kırklareli Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 5(2), 93-108. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/265272>
- Eti, H.S. (2017). Organik gıda tüketicilerinin belirlenmesi: Teşvik unsurları, güven yönelimleri ve satın alma davranışı. *Balkan ve Yakın Doğu Sosyal Bilimler Dergisi*, 03, 88-94. https://www.ibaness.org/bnejss/2017_03_special_issue/10_Eti_1.pdf
- George, D., & Mallery, P. (2010). *SPSS for Windows step by step: a simple guide and reference, 17.0 update* (10th ed.). Allyn & Bacon. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001424067>
- Govindasamy, R., & Italia, J. (1999). Predicting willingness-to-pay a premium for organically grown fresh produce. *Journal of Food Distribution Research*, 30(1), 44-53. <https://ageconsearch.umn.edu/record/27385/?v=pdf>
- Gracia, A., & De Magistris, T. (2008). The demand for organic foods in the south of Italy: A discrete choice model. *Food Policy*, 33 (5), 386-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2007.12.002>
- Grankvist, G., Biel, A., & Thøgersen, J. (2004). The impact of environmental labeling on consumer preference: Negative vs. positive labels. *Journal of Consumer Policy*, 27(2), 213-230. <https://link.springer.com/article/10.1023/B:COPO.0000028167.54739.94>
- Gül, F., & Dikmen, D. (2018). Kadın tüketicilerde besin etiketi okuma alışkanlıkları ve alerjen bilgi düzeyinin saptanması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(2), 157-165. <https://doi.org/10.33076/2018.BDD.300>
- Gül, K., & Gül, M. (2020). Üniversite Öğrencilerinin Yiyecek Seçimi ve Beslenme Alışkanlıkları: Balıkesir Üniversitesi Örneği. *Journal of Recreation and Tourism Research*, 7(4), 551-574. <https://doi.org/10.31771/jrtr.2020.77>
- Gürbüz, İ. B., Gemeç, E., & Kadağan Ö. (2023). Tüketicilerin beyaz et tercihlerini etkileyen faktörler ve gıda harcamaları içerisinde beyaz etin payı: Bursa İli Örneği. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi*, 37(2), 343-363. <https://doi.org/10.20479/bursauludagziraat.1246637>
- Güven, S., & Pekmezci, P. (2015). Tüketicilerin organik ürünlere bakışı ve tüketicileri organik organik ürünlere yönlendiren motivasyonlar. *Hacettepe Üniversitesi Sosyolojik Araştırmalar e-dergisi*, https://web.archive.org/web/20220223065700/http://www.sdergi.hacettepe.edu.tr/makaleler/TUKETICILERIN_ORGANIK_URUNE_BAKIS_23HAZ2015.pdf
- Hassan, H.E., Nady, F., Youness, E., & Zahran, K. (2016). Call for change level of knowledge, awareness and attitude to follow a high folate diet among pregnant women. *IOSR Journal of Nursing and Health Science* 5(1), 93-100. www.iosrjournals.org
- Hoogenboom L. A. P., Bokhorst J. G., Northolt M. D., Van De Vijver L. P. L., Broex N. J. G., Mevius D. J., Meijs J. A. C., & Van Der J. (2008). Contaminants and microorganisms in dutch organic food products: a comparison with conventional products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(10), 1195-1207. <https://doi.org/10.1080/02652030802014930>
- Hughner, R. S., Mcdonagh, P., Prothero, A., Shultz, C. J., & Stanton, J. (2007). Who are organic food consumers? A compilation and review of why people purchase organic food. *Journal of Consumer Behaviour*, 6(2-3), 94-110. <https://doi.org/10.1002/cb.210>
- Huo, H., Ahmad, F.S., & Teoh, B. (2024). Factors affecting consumers' organic food purchase behavior: A systematic literature review and future research agenda. *Environment and Social Psychology*, 9(2), 1892. <https://doi.org/10.54517/esp.v9i2.1892>
- Iqbal, M. (2015). Consumer behaviour of organic food: a developing country perspective. *International Journal of Marketing and Business Communication*, 4(4), 59-68. <http://www.publishingindia.com>
- İnan R., Bekar A., & Uurlu H. (2021) Tüketicilerin organik gıda satın alma davranışları ve tutumlarına ilişkin bir değerlendirme. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 9 (1), 220-235. <https://doi.org/10.21325/jotags.2021.786>
- İnci, H., & Karakaya E. (2021). TRC Güneydoğu Anadolu Bölgesi TRC2 VE TRC3 alt bölgelerinde organik ürün üretim ve tüketim durumu. *Türkiye'de Organik Tarım ve Agro-Ekolojik Gelişmeler*, (Eds.: K. Kökten, & H. İnci), (s. 3-26), Iksad Publishing.
- İnci, H., Karakaya E., & Şengül A. (2017). Organik ürün tüketimini etkileyen faktörler (Diyarbakır ili örneği). *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20 (2), 137-147. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ksudobil/issue/27437/288573>
- Janssen, S. J. C., & van Ittersum, M. K. (2007). Assessing farm innovations and responses to policies: A review of bio-economic farm models. *Agricultural Systems*, 94(3), 622-636. <https://doi.org/10.1016/j.agry.2007.03.001>
- Kadirhanogulları, İ. H., Kadirhanogulları, M. K., Kara, M. K., & Kumlay, A. (2022). Iğdır İl'inde organik gıda bilgi düzeyinin belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütcü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(4), 882-889. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogu.vi.890284>
- Kamboj, S., Matharu, M., & Gupta M. (2023). Examining consumer purchase intention towards organic food: an empirical study. *Clean. Responsible Consum.*, 9, 100121. <https://doi.org/10.1016/j.clrc.2023.100121>
- Kamenidou, I.C., Mamalis, A.S., Pavlidis, S. & Bara, E.Z. (2019). Segmenting the generation Z cohort university students based on sustainable food consumption behavior: A preliminary study. *Sustainability*, 11(837), 1-22. <https://doi.org/10.3390/su11030837>
- Karabaş, S., & Gürler, A.Z. (2012). Organik ürün tercihinde tüketici davranışları üzerine etkili faktörlerin logit regresyon analizi ile tahminlenmesi. *Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 5, 129-156. <https://doi.org/10.14520/adyusbd.272>
- Kart, M. Ç. Ö., & Demircan, V. (2014). Dünyada ve Türkiye'de süt ve süt ürünleri üretimi, tüketimi ve ticaretindeki gelişmeler. *Akademik Gıda*, 12(1), 78-96. <https://dergipark.org.tr/en/pub/akademik-gida/issue/55791/763730>
- Kızılaslan, N., & Kızılaslan, H. (2008). Tüketicilerin satın aldıkları gıda maddeleri ile ilgili bilgi düzeyleri ve tutumları (Tokat ili örneği). *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(2), 67-74. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ziraatuludag/issue/16752/174167>
- Kiye, S., Yoncalık, O., & Nazlı, S. (2020). Lisans 1. sınıf öğrencilerinin üniversite yaşamına uyum sürecinde akran danışmanlarının rolü. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 28(6), 2346-2361. <https://doi.org/10.24106.kefdergi.689350>
- Koççal, E., İrkin, R., Özüm Geyiktepe, E., & Konakçı, G. (2022) Faculty of health sciences students' views and preferences on organic foods. *Progress in Nutrition*, 24(1), e2022018. <https://doi.org/10.23751/pn.v24i1.12015>
- Konca Y., Büyükkılıç S., Metin J. Adkinson A. Y., & Özkan M. (2010). Organik ve konvansiyonel metotla yetiştirilen hayvanlardan elde edilen ürünlere bazı özelliklerin karşılaştırılması. *Türkiye I. Organik Hayvancılık Kongresi* 1-4 Temmuz 2010, 1-10, Kelkit.

- Kumar, M.S., & Dhanalakshmi, A. (2018). A study on youth attitude towards organic food products in salem district with reference to college students. *Asian Journal of Management*, 9(1), 54-58. <https://doi.org/10.5958/2321-5763.2018.00008.2>
- Küçük, U. (2019). Paramedik öğrencilerinin beslenme durumları ve etkileyen faktörler. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 3(1), 1-10. <https://dergipark.org.tr/en/pub/amusbfd/issue/42985/336084>
- Liu, C., Liu, X., Yao, L. & Liu, J. (2023), "Consumer preferences and willingness to pay for eco-labelled eggs: a discrete choice experiment from Chongqing in China", *British Food Journal*, 125 (5), 1683- 1697. <https://doi.org/10.1108/BFJ-12-2021-1305>
- Magnusson, M.K., Arvola, A., Koivisto Hursti, U., Åberg, L. & Sjöden, P. (2001). Attitudes towards organic foods among Swedish consumers. *British Food Journal*, 103 (3), 209-227. <https://doi.org/10.1108/00070700110386755>
- Malkoç, N., Yaşar, O., Turgut, M., Kerem, M., Köse, B., Atlı, A., & Sunay, H. (2020). Healthy nutrition attitudes of sports science students. *Progress in Nutrition*, 22(3), 1-7. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i3.9480>
- Manuelian, C.L., Penasa, M., da Costa, L., Burbi, S., Righi, F., & De Marchi, M. (2020). Organic livestock production: A bibliometric review. *Animals*, 10(4), 618. <https://doi.org/10.3390/ani10040618>
- McReynolds, K., Gillian, W., & Naquin, M. (2017). An examination of college students' knowledge, perceptions and behaviors regarding organic foods. *American Journal of Health Education*, 49(1), 48-55. <https://doi.org/10.1080/19325037.2017.1399837>
- Migliore, G., Borrello, M., Lombardi, A., & Schifani, G. (2018). Consumers' willingness to pay for natural food: evidence from an artefactual field experiment. *Agriculture Economy* 6, 21. <https://doi.org/10.1186/s40100-018-0117-1>
- Mizia, S., Felińczak, A., Włodarek, D., & Syrkiewicz-Swiatała, M. (2021). Evaluation of Eating Habits and Their Impact on Health among Adolescents and Young Adults: A Cross-Sectional Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (3996), 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijerph18083996>
- Mulder R. M., & Liu L. R. (2017). Consumer awareness and motivation for organic food consumption: exploring the environmental and health considerations surrounding the production of organic food; understanding perspectives on organic products from the consumer, Producer and Retailer. *Deciphering Organic Foods: A Comprehensive Guide To Organic Food Consumption* (Eds.: I. Karaklas, D. Muehling), (p. 1-27), Nova Publishing.
- Oğul, M. (2019). Organik hayvansal ürünlere karşı algı, tutum ve davranışların incelenmesi; Samsun ili örneği. (Yayın No: 561807) [Yüksek Lisans tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi] www.ulusaltezmerkezi.com
- Ordovas, J. M., & Berciano, S. (2020). Personalized nutrition and healthy aging. *Nutrition Reviews*, 78(Supplement_3), 58-65. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa102>
- Örük, G. (2021). Livestock product consumption of university students: The case of Siirt University. *Journal of Animal Production*, 62(1), 45-51. <https://doi.org/10.29185/hayuretim.756763>
- Özden, A.T., & Ozişik Yapıcı, O. (2021). Tüketicilerin ekolojik zekaları ile organik gıda tüketim eğilimleri arasındaki ilişki üzerine bir araştırma. *Journal of Emerging Economies and Policy*, 6(2), 368-381. <https://dergipark.org.tr/en/pub/joeep/issue/60720/992173>
- Rana J., & Paul J. (2017). Consumer behavior and purchase intention for organic food: a review and agenda. *Journal of Retailing And Consumer Services*, 38, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2017.06.004>
- Sandalıoğlu, A. (2014). Adana ilinde organik tarım ürünleri tüketimi ve tüketici eğilimleri. (Yayın No: 353652) [Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi] www.yoktez.gov.tr
- Sarıca, D., Michael G.D., & İlyas, O. (2023). Üniversite öğrencilerinin organik gıda tüketim davranışlarını etkileyen faktörlerin ekonometrik analizi: Isparta ili örneği. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 60 (1), 111-123. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1180141>
- Saunders, M., Lewis, P., & Thornhill, A. (2007). *Research Methods for Business Students*. 4th Edition, Financial Times Prentice Hall.
- Sevinç, G., Cañçelik, M., Palabıçak, M. A., & Sevinç, M. R. (2021). Şanlıurfa ilinde tüketicilerin köy ürünleri ve köy ürünleri satan işletmelere yönelik tutumları. *Elektronik Sosyal Bilimler Dergisi*, 20(78), 614-629. <https://doi.org/10.17755/esosder.741564>
- Sezgin, A., & Uzundumlu, A. (2019). Organik ürün tüketimi üzerine etkili olan faktörlerin analizi; Erzurum ili örneği. *IBAD Sosyal Bilimler Dergisi*, 441-451. <https://doi.org/10.21733/ibad.613411>
- Średnicka-Tober D, Barański M, Seal C, Sanderson R, Benbrook C, Steinshamn H, Gromadzka-Ostrowska J, Rembiałkowska E, Skwarło-Sońta K, Eyre M, Cozzi G, Krogh Larsen M, Jordon T, Niggli U, Sakowski T, Calder PC, Burdge GC, Sotiraki S, Stefanakis A, Yölcü H, Stergiadis S, Chatzidimitriou E, Butler G, Stewart G, & Leifert C. (2016). Composition differences between organic and conventional meat: A systematic literature review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 115(6), 994-1011. <https://doi.org/10.1017/S0007114515005073>
- Svecova, J. & Odehnalova, P. (2019). The determinants of consumer behavior of students from Brno when purchasing organic food. *Review of Economic Perspectives*, 19(1), 49-64. <https://doi.org/10.2478/revecp-2019-0003>
- Şahin Demirel, A N, & Yercan, M. (2022). Organik ürün pazarındaki tüketicilerde organik ürün bilinci: İstanbul ve İzmir illeri örneği. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1), 489-501. <https://doi.org/10.21597/jist.952417>
- Taşkın, T., Engindeniz, S., Gbadamonsi, A.A., Kandemir, Ç, & Koşum, N. (2020). Gençlerin kırmızı et tüketim tercihlerinin analizi: Ege Üniversitesi öğrencileri örneği. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 57 (1), 63-71. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.587525>
- Tavşancıl, E. (2002). *Tutumların ölçülmesi ve SPSS ile veri analizi*. Nobel Yayınları.
- Tenenbaum, H. R., Winstone, N. E., Leman, P. J., & Avery, R. E. (2020). How effective is peer interaction in facilitating learning? A meta-analysis. *Journal of Educational Psychology*, 112(7), 1303-1319. <https://doi.org/10.1037/edu0000436>
- Tıraşçı, S., Ümmügülüm, E., & Aksakal, V. (2020). Organic agriculture in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(11), 2348-2354. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i11.2348-2354.3505>
- Töli, C., Akbağ, H.I., Yurtman, İ.Y., & Savaş, T., (2020). Organic animal farming in Turkey: Philosophy and practice. *J. Anim. Prod.*, 61 (1): 73-81. <https://doi.org/10.29185/hayuretim.675699>
- Turan, B., & Demircan, V. (2021). Organik ürün tüketiminin mevcut durumu ve tüketimi etkileyen faktörler: Isparta ili örneği. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(2), 154-168. <https://dergipark.org.tr/en/pub/sduzfd/issue/66191/980648>
- Turan, Z., Şanver, D., & Öztürk, K. (2017). Türkiye'de hayvancılık sektöründen süt inçiliğinin önemi ve yurt içi hasılaya katkısı ve de dış ülkelerle karşılaştırılması. *Ömer Halisdemir Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 10(3), 60-74. <https://doi.org/10.25287/ohuibf.309212>
- Ustaahmetoğlu E., & Toklu, İ.T. (2015). Organik gıda satın alma niyetinde tutum, sağlık bilinci ve gıda güvenliğinin etkisi üzerine bir araştırma. *AİBÜ-İİBF Ekonomik ve Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 11(1), 197-211. <https://dergipark.org.tr/en/pub/esad/issue/38955/456061>

- Vargas-Bello-Pérez E., Tajonar K., Foggi G., Mele M., Simitzis P., Mavrommatis A., Tsiplakou E., Habib M.R., Gonzalez-Ronquillo M., & Toro-Mujica P. (2022). Consumer attitudes toward dairy products from sheep and goats: A cross-continental perspective. *Journal of Dairy Science*, 105, 8718-8733. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21894>
- Varoğlu S.T., & Turhan Ş. (2016). Consumption trend of organic product and determination of consumer profile: A case study of Sakarya. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(3), 189-196. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122624/records/64747421425ec3c088f35a23>
- Vural, Y., Ferriday, D., & Rogers P.J. (2023), Consumers' attitudes towards alternatives to conventional meat products: expectations about taste and satisfaction, and the role of disgust, *Appetite*, 181, 106394. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2022.106394>
- Yıldırım, İ., Yıldırım, Y., Tortop, Y., & Poyraz, A. (2011). Afyon Kocatepe Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu öğrencilerinin beslenme alışkanlıkları ve bunları etkileyen faktörler. *Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi*, 8(1), 1375-1391. https://www.researchgate.net/profile/Irfan-Yildirim-2/publication/50855304_Nutrition_habits_of_Physical_Education_and_Sport_High_School_students_of_Afyon_Kocatepe_University_and_factors_affected_the_the_nutrition_habits_of_Physical-Education-and-Sport-High-School-students-of-Afyon-Kocatepe-University-and-factors-affected-the-the-nutrition-habits.pdf
- Yiridoe, E. K., Bonti-Ankomah, S., & Martin, R. C. (2005). Comparison of consumer perceptions and preference toward organic versus conventionally produced foods: A review and update of the literature. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 20(4), 193-205. <https://doi.org/10.1079/RAF2005113>



Antioxidative, Antimicrobial Activities and Fatty Acid Compositions of Four Agarics

Şükrü Canpolat^{1,a,*}, Elif Yürümez Canpolat^{2,b}, Yasemin İşlek^{3,c}, Ilgaz Akata^{4,d}, Cemil İşlek^{2,e}

¹Central Laboratory Research Center, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240 Niğde, Türkiye

²Department of Biotechnology, Faculty of Science, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240 Niğde, Türkiye

³Department of Electronics and Automation, Vocational School of Technical Sciences, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240 Niğde, Türkiye

⁴Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, 06560 Ankara, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 01.07.2024 Accepted : 15.08.2024</p> <p>Keywords: Agarics Antioxidant Antimicrobial activity Fatty acids GC-MS</p>	<p>The edible mushrooms are valued by people because they possess a large variety of secondary metabolites with diverse beneficial effects on human health. The Agaricales order is one of the largest taxon in fungal systematics represented by a number of edible species in Türkiye. This study aimed to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities, as well as the fatty acid composition, of four Agarics (<i>Agaricus bitorquis</i>, <i>Coprinopsis atramentaria</i>, <i>Coprinellus micaceus</i>, and <i>Leucoagaricus leucothites</i>) collected from Niğde Province, Türkiye. The antioxidant capability was determined using DPPH assay and the total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu's phenol reagent technique. Among the four species, <i>A. bitorquis</i> showed the highest DPPH radical scavenging activity (84.259±1.32%) and total phenolic content (1472.21±10.35µg GAE/mL). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique was performed for the analysis and characterization of the fatty acid compositions. Linoleic acid was the major fatty acid detected in all four species, with percentages ranging from 23.58% to 42.96%. The antimicrobial activity of the mushroom extracts was assessed using the disc diffusion method, and the ethanol extract of <i>C. atramentaria</i> showed the most significant effect on <i>E. coli</i> with a 29±0.6 mm inhibition zone diameter.</p>

^a sukrucanpolat@ohu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0001-8223-7260>

^c ymeric@ohu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-1823-6746>

^e cislek@ohu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-6690-2846>

^b elif.yurumez@ohu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-1470-1169>

^d akata@science.ankara.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-1731-1302>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

The kingdom Fungi is one of the largest taxa in systematics, with over 150000 species (Species Fungorum, October 2022) across diverse life forms (saprophytism, parasitism, and mutualism). It is estimated that over a million fungal species are reserved to be described (Hibbett et al., 2016; Nilsson et al., 2019).

Identification of mushroom species is highly dependent on the morphology of the sample, such as the size and shape of the cap, gills, stem, and spore structures. Moreover, the ecology of the mushroom sample reveals a lot about the species. However, the identification of mushrooms in terms of morphological features may need to be more accurate, particularly for relatively close species. Molecular techniques, including isolation, amplification, and sequencing of the conserved regions through the evolutionary period of nuclear DNA, help to identify mushroom samples more accurately by comparing the sequence data with molecular databases. In the case of

identification of the mushroom species, the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the rDNA, which is approximately 700 bp long and a highly conserved fragment, is mainly used because of its high inter-species variation (Lücking et al., 2020; Giusti et al., 2021).

Free radicals are one or more non-paired electrons bearing unstable compounds that usually act as intracellular signals that regulate some cell functions. Reactive oxygen species (ROS) are oxygen-containing free radicals. The accumulation of ROS in cells, resulting in oxidative stress, can cause severe chronic illnesses like diabetes, Parkinson's, cardiovascular disorders, Alzheimer's, and infertility (Aytar et al., 2020; Emsen and Güven, 2020). The natural defense systems of the organisms depend on the endogenous antioxidants capable of capturing and stabilizing free radicals. In recent years, natural sources of antioxidants have been significant due to their fewer side effects than synthetic ones. Phenolic

compounds obtained from herbal sources are valuable antioxidants since they act as reducing agents, singlet oxygen scavengers, metal chelators, and hydrogen donors. Mushrooms are known to produce and accumulate various secondary metabolites with antioxidant properties, including polyketides, steroids, terpenes, polysaccharides, and polyphenols (Pizzino et al., 2017; Taviano et al., 2018; Özdal et al., 2019).

Fatty acids are organic molecules comprising carbon chains, a methyl group at one end and a carboxyl group at the other. They play a pivotal role in metabolic processes. Energy storage and transportation, insulation against mechanical, thermal, and electrical factors, signal transportation and gene regulation, and utilization as cell membrane constituents may be listed as some of the functions of fatty acids (Rustan and Drevon, 2001).

The studies on the fatty acids involved in the human diet indicate that low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in plasma increases with saturated fatty acids, while it decreases with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (Mensink et al., 2003). It was also suggested by the Food and Agriculture Organization and the World Health Organization that total fat intake in dietary energy should be 20-35%, including <10% saturated fatty acids, <1% trans fatty acids, 3-13% monounsaturated fatty acids and 6-11% polyunsaturated fatty acids (Salter, 2013).

Antimicrobial resistance evolved by the microorganisms via misuse and/or overuse of antibiotics is a global concern that results in prolonged hospital stays, expensive and intensive health care, and even death from infections caused by the pathogen organisms. It has been estimated that approximately 25.000 deaths occur annually in Europe as a result of infections caused by antibiotic-resistant bacteria (Davies et al., 2013). Strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella spp.* are the most commonly reported antibiotic resistant bacteria (MacGowan and Macnaughton, 2017). People's ability to prevent and treat bacterial infections factors is reduced by the pathogens, which recurrently acquire new resistance factors, although the flow of bacteria and genes is restricted by multiple natural barriers (Larsson and Flach, 2022). Thus, is important to identify novel antimicrobial agents capable of preventing and/or treating infections, as well as increasing society's awareness about the use of antibiotics.

Many non-toxic bioactive compounds naturally synthesized by mushrooms with anti-allergic, anti-inflammatory, anti-tumoral, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, and immune system boosting effects have attracted so many researchers to investigate mushroom species (Lindequist et al., 2005; Akata et al., 2019; Badalyan et al., 2019; Bal et al., 2019; Canpolat et al., 2021; Saridogan et al., 2021;) not only for describing new species but also in terms of biochemical constituents of these mushrooms (Ribeiro et al., 2009; Akata et al., 2012; Pereira et al., 2012; Günç Ergönül et al., 2013; Dogan et al., 2013; Yılmaz et al., 2013).

The objective of this study was to determine the total phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities, and fatty acid compositions of four Agarics collected from Niğde, Türkiye.

Materials and Methods

Materials

Fruiting bodies of the mushroom species were collected between 2019 and 2020 from Niğde, Türkiye. According to the current literature, all samples were identified due to morphological traits (Wasser, 1977; Breitenbach and Kränzlin, 1986; Redhead et al., 2001) by Prof. Dr Ilgaz AKATA, Ankara University. All samples were photographed in the locations where they were collected. Environmental conditions, altitudes, and phenological properties (size, shape, color, odor...etc.) belonging to samples were noted. Subsequently, the identified samples were subjected to freeze-drying and stored in the laboratory until further analysis.

Molecular Identification

Identification through the morphological traits of mushroom samples may need to be more accurate, particularly for relatively close species. Thus, molecular techniques based on the nuclear ribosomal ITS region, which is widely used for identifying fungal species (Schoch et al., 2012), were performed to prevent possible confusion at the species level.

Macherey-Nagel™ Nucleospin Plant II kit, was employed for the purpose of extracting DNA from the mushroom samples. ITS regions of the nuclear DNA were amplified by PCR using ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers developed by White et al. (1990). PCR mixture comprises 2 µL of each primer (10 pm/µL), 3 µL of the DNA sample, 25 µL of the DreamTaq master mix, and 18 µL of sterile distilled water, resulting in a final volume of 50 µL.

Following agarose gel electrophoresis sequence analyses were conducted by BM Labosis (Ankara, Türkiye) for the PCR products. The data obtained from sequence analyses were compared with the NCBI GenBank database using the BLAST to identify the mushroom samples.

Mushroom Extracts

Dried mushroom samples were weighed (10 g) and pulverized by a mortar and pestle. Powdered materials were combined with 100 mL of solvent, which was ethanol and methanol and the mixture was homogenized by WiseTis HG-15d homogenizer (DAIHAN Scientific) at 8000 rpm for 3 min. The homogenized samples were incubated for 24 h at 30 °C at 150 rpm. Subsequently, extracts were filtered via filter papers, and a rotary evaporator (HeiVap Value, Heidolph) was used to evaporate the solvents. The residues were used to prepare 200 mg/mL extracts, which were kept at +4°C for further use.

Antioxidant Activity Assay

The ethanolic extracts of the mushroom samples were tested for antioxidant activity using the DPPH scavenging technique. Dark-colored powder DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) has a maximum light absorption of 517 nm (Blois, 1958; Shimada et al., 1992). The mushroom extracts were serially diluted five times and a 0.1 mM DPPH solution was prepared with ethanol. After adding an aliquot of 100 µL extract and giving the 2.9 mL DPPH

solution a good shake, the mixture was left to incubate for 15 min at room temperature in the dark.

Following incubation, a spectrophotometer (MultiSkan GO, Thermo) was used to detect the mixture's absorbance at 517 nm. The following formula was used to evaluate the DPPH scavenging activity of the mushroom extracts;

$$\% SA = \frac{ADPPH - ASample}{ADPPH} \times 100$$

where %SA is the % DPPH scavenging activity of the extracts, ADPPH is the absorbance of 0,1 mM DPPH solution at 517 nm, and ASample is the absorbance of the sample at 517 nm.

Total Phenolic Compounds

Folin-Ciocalteu's reagent and previously prepared methanolic extracts were used for the determination of total phenolic components. A standard curve was established using gallic acid (GA) to determine the total phenolic contents of mushroom samples. 100 µL extract was added to 1 mL Folin-Ciocalteu's reagent and shaken. Subsequently, 1 mL of a 7.5% Na₂CO₃ solution was added to the mixture, which had been prepared five minutes previously. After that, the mixture incubated for 90 min at room temperature. The absorbance of the samples absorbance was determined at 765 nm using a spectrophotometre, and the total amount of phenolic compounds was represented in terms of µg GAE/mL extract (Singleton et al., 1999).

Antimicrobial Activity Test

The disc diffusion method was employed to ascertain the antibacterial activity of the mushroom extracts against specific microorganisms. The test microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* SL1344, *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071 and *Bacillus subtilis* DSMZ 1971. Luria-Bertani (LB) broth medium was used to inoculate bacterial strains, which were then incubated at 37°C for 24 h. The turbidity of the microbial cultures was adjusted to 0.5 McFarland standard.

For the disc diffusion method, 100 µL of bacterial inoculum was plated by a sterile drigalski spatula on an LB agar medium. Following a five-minute incubation period, sterile discs with a diameter of 6 mm were placed on LB agar medium. These discs included 15, 30, and 60 µL aliquots of mushroom extracts, and were incubated for 24 h at 37°C. Following incubation, the diameters of the inhibition zones around the paper discs were measured and expressed in mm. Antibiotic discs comprised of vancomycin (30µg/disc) and gentamycin (10µg/disc) were utilized as a positive control, while solvents (ethanol or methanol) and empty discs served as a negative control.

Fatty Acid Compositions

The fatty acid compositions of the mushroom samples were ascertained by GC-MS. For this purpose, dried powders of mushroom samples were extracted by hexane. 40 mL of hexane was added to 0.5 g of mushroom sample, homogenized by WiseTis HG-15d homogenizer (Daihan Scientific) for 3 min at 8000 rpm and incubated at 40 °C for 30 min in an ultrasonic bath (Sonorex, Bandelin). A

rotary evaporator was used to remove the solvent after the extract was filtered through a filter paper.

The residue was re-suspended with 5 mL of hexane, and 0.2 mL of 2M KOH in methanol was added and shaken for 1 min. The mixture was incubated in the dark for 6 min. Then, 0.45 mL of 1N HCl was added to the mixture and incubated for an additional 20-30 min in the dark for the phase separation. After phase separation, the upper layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered through a syringe filter with a pore diameter of 0.45 µm, and injected into the GC-MS (Canpolat and İşlek, 2022).

Shimadzu QP2010-Ultra GC-MS system equipped with Restek Rxi-5MS column (30 m * 0.25 mmID * 0.25 µm df) was used to determine the fatty acid compositions of the mushroom samples. The analysis conditions were as follows: The injection port temperature was 240 °C. One µL of the sample was injected into GC with a split ratio of 1:40. Injections were performed by AOC2.0i autosampler. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.78 mL/min. The initial oven temperature was set to 40 °C and held for 1 min, increased to 160 °C with a rate of 5 °C/min and held for 3 min, and increased again to 250 °C with a rate of 5 °C/min and held for 11 min. The interface and the ion source temperatures were 270 and 200 °C, respectively. All mass spectra were acquired in Electron Impact (EI) mode. The mass ranged between 40 to 650 m/z with a scan rate of 5 scans/sec in full scan mode. Ionization was maintained for the first 5 min to avoid solvent overload (Ribeiro et al., 2009). The compounds were identified by comparing the mass spectra with those from the Wiley mass spectra library (W9N11) and Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds library (FFNSC 1.2).

Results and Discussion

Identification of Mushroom Samples

The mushroom samples investigated in this study were identified both in terms of morphological characteristics based on the available literature (Wasser, 1977; Breitenbach and Kränzlin, 1986; Redhead et al., 2001). The mushroom samples were identified due to BLAST results that indicate the interspecific variations occurred in the sequence data. GenBank is the most widely attended database by researchers who want to compare molecular data with previous studies because it is online and easy to access.

In this study, the investigated mushroom species were identified as *Agaricus bitorquis* (Qué.) Sacc. (1887) (Accession number PQ164268), *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead Vilgalys & Moncalvo (2001) (Accession number PQ164269), *Coprinellus micaceus* (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson (2001) (Accession number PQ164275), *Leucoagaricus leucothites* (Vittad.) Wasser (1977) (Accession number PQ164271), which had similarity rates of 99.93; 99.94; 100 and 100 %, respectively. (Photograph 1).

Total Phenolic Compounds

The total phenolic content amounts of mushrooms extracted with methanol are shown in Figure 1. The range of total phenolic content was extensive, from 328.42±3.45 to 1472.21±10.35 µg GAE/mL. When the total phenolic substance content results were examined, it was determined that the mushroom species with the highest

range was *A. bitorquis*. In contrast, the lowest total phenolic substance content was found in *C. atramentaria*.

While Heleno et al. (2012) found the total phenolic compounds in *C. atramentaria* to be 33.58 mg GAE/g our study revealed that the total phenolic compounds in *C. atramentaria* were 328.42 µg GAE/mL (Figure 1). In another study, researchers found that *C. atramentaria* had 449.93 mg GAE/g of total phenolic compounds (Kaya et al., 2021). In our investigation, the total phenolic compounds in the *A. bitorquis* species were determined to be 1472.21 µg GAE/mL, whereas Gasecka et al. (2018) stated the total phenolic compounds in *A. bitorquis* as 654.7±25.5 mg GAE/100 g DW. Selem et al. (2021) determined the total phenolic content of *C. micaceus* as 22.10 mg GAE kg⁻¹ FW in the stem and 26.22 mg GAE kg⁻¹ FW in the cap. Our study determined the total amount of phenolic compounds as 462.56 µg GAE/mL in the whole mushroom.

In our study, total phenolic compound measurements are consistent with some of the research described above but not others. The variety in the physicochemical characteristics of the fungi, such as sugar structure, molar weights, and polysaccharides in their structure, is assumed to be the cause of the discrepancy in the results obtained from the extracts.

Antioxidant Activity

The scavenging activity of free radicals was evaluated using the DPPH assay, and the results are presented in Figure 2. Among the tested species, *A. bitorquis* (84.259±1.32%) showed the highest DPPH scavenging activity; on the other hand, *C. micaceus* (35.351±0.37%) showed the lowest DPPH scavenging activity. The increased amount of phenolic compounds in *A. bitorquis* mushroom is thought to be related to its antioxidant activity. Phenolic compounds act as hydrogen donors and effective antioxidants. The correlation between mushroom phenolics and antioxidant activity is well documented (Tsai et al., 2007; Kim et al., 2008; Gan et al., 2013; Düşgün et al., 2021). A significant positive correlation was observed between antioxidant activity, as indicated by the percentage inhibition of the DPPH radical, and total phenolics. This suggests that phenolic compounds act as scavengers of free radicals, potentially providing an antioxidative function. Several studies on various mushroom species have demonstrated a strong correlation between scavenging activity and total phenolics (Kim et al., 2008; Heleno et al., 2015). Researchers proposed that the antioxidant capabilities of phenolics may also be assigned to their ability to donate hydrogen and eliminate DPPH (Dubost et al., 2007; Gasecka et al., 2018).

It is known that the different components responsible for antioxidant activity differ according to mushroom species. The concentration of functional groups in mushrooms can also be affected by their developmental status (Kaya et al., 2021). The meteorological conditions in which the mushrooms grow, the conditions of the extraction, and the variations in drying procedures are assumed to be the causes of the discrepancies between the obtained data and literature data. The ethanolic extract may possess compounds other than phenolics that contribute to its antioxidant properties, which can enhance the effects of phenolics. This may be due to the Folin-Ciocalteu assay,

which potentially yields elevated results due to ascorbic acid, carbohydrates, and specific amino acids such as tryptophan or tyrosine (Palacios et al., 2011).

Antimicrobial Activity

The incidence of diseases caused by microorganisms has considerably increased in recent years (Mancuso et al., 2021). Due to the increase in resistant microorganisms and the side effects of antibiotics used against microorganisms, studies have been directed toward the discovery of novel natural products. In this context, researchers are trying to identify antimicrobial agents, especially by investigating novel natural products. (Sevindik and Bal, 2021; Saridoğan et al., 2021).



Photograph 1: Mushroom samples used in this study: *Agaricus bitorquis* (A), *Coprinopsis atramentaria* (B), *Coprinellus micaceus* (C) and *Leucoagaricus leucothites* (D)

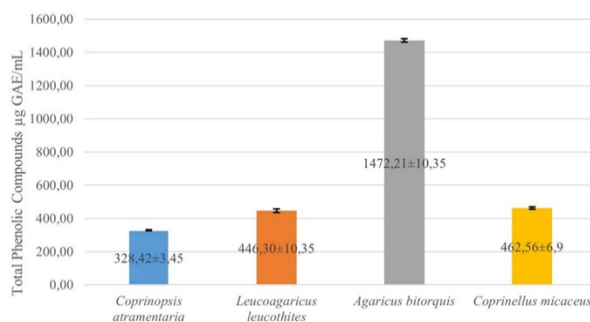


Figure 1. The content of total phenolic compounds in mushroom samples

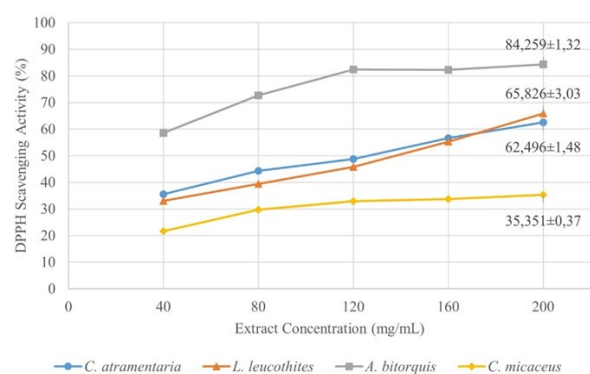


Figure 2. DPPH scavenging Activity (%) of Mushroom Species

Table-1. Antimicrobial activity of ethanolic extracts against test microorganisms

Test Microorganisms	Inhibition Zone Diameters (mm)													
	CN	VA	<i>A. bitorquis</i>			<i>C. atramentaria</i>			<i>C. micaceus</i>			<i>L. leucothites</i>		
			15	30	60	15	30	60	15	30	60	15	30	60
<i>P. aeruginosa</i>	20	10	14±0.6	19±0	26±1.2	13±0.6	19±1.2	26±2.3	12±0	19±0	25±0.6	11±1.2	15±1.5	21±1.2
<i>B. subtilis</i>	21	8	11±2.1	13±0.2	16±1.0	nd	nd	15±0.6	nd	nd	12±0.6	nd	nd	15±0.6
<i>S. aureus</i>	21	8	13±1.5	18±0	22±1.2	13±0.6	17±1.2	23±1.5	13±0.6	14±1.5	22±2.1	11±1.0	15±1.0	23±0.6
<i>E. coli</i>	20	12	14±0	20±0.6	28±1.5	13±1.5	19±1.0	29±0.6	12±1.2	17±0.6	24±0.6	11±1.2	16±0.6	23±1.5
<i>S. typhimurium</i>	22	17	15±1.2	20±1.2	25±0.6	13±1.2	19±1.5	24±1.0	13±0.6	15±1.2	16±0.6	11±0	14±0.6	22±1.2

* CN: Gentamycin (10µg/disc), VA: Vancomycin (30µg/disc), nd: not detected

Table-2. Antimicrobial activity of methanolic extracts against test microorganisms.

Test Microorganisms	Inhibition Zone Diameters (mm)													
	CN	VA	<i>A. bitorquis</i>			<i>C. atramentaria</i>			<i>C. micaceus</i>			<i>L. leucothites</i>		
			15	30	60	15	30	60	15	30	60	15	30	60
<i>P. aeruginosa</i>	20	10	9.7±1.2	15±0.6	18±0.6	10±1.2	13±0.6	17±0.6	11±0.6	14±0.6	19±1.2	11±1.2	14±0.6	18±0.6
<i>B. subtilis</i>	21	8	11±0	12±1.2	18±0	9.7±0.6	13±0	17±1.0	7.7±0.6	9±0	15±0.6	7±0	12±0	14±1.2
<i>S. aureus</i>	21	8	10±0.6	15±0.6	18±0.6	10±1	13±1.0	20±0.6	11±0	15±0	21±0.6	9.3±0.6	14±0	19±1.5
<i>E. coli</i>	20	12	10±1.2	14±1.5	17±0.6	11±0.6	13±0.6	17±0	11±0.6	15±0.6	20±0.6	9.3±0.6	12±0.6	18±0.6
<i>S. typhimurium</i>	22	17	8.7±0.6	12±0	17±0.6	9.7±0.6	14±1.7	20±1.5	10±1.0	14±0.6	18±1.2	9.7±0.6	14±1.2	17±0.6

* CN: Gentamycin (10µg/disc), VA: Vancomycin (30µg/disc), nd: not detected

In this study, the antimicrobial effects of ethanol and methanol extracts of *A. bitorquis*, *C. atramentaria*, *C. micaceus*, and *L. leucothites* against various test microorganisms were investigated using the disc diffusion method. Blank and solvent bearing sterile discs used as negative control did not show any activity.

The results obtained from disc diffusion test demonstrated that the largest inhibition zone was formed by ethanolic extract of *C. atramentaria* (60 µL) against *E. coli* with 29±0.6 mm while ethanolic extract of *A. bitorquis* (15 µL) exhibited the lowest inhibition effect against *B. subtilis* with 11±2.1 mm (Table 1). On the other hand methanolic extract of *C. micaceus* (60 µL) showed the highest inhibition against *S. aureus* with 21±0.6 mm while the lowest inhibition was exhibited by *L. leucothites* methanol extract (15 µL) with 7±0 mm against *B. subtilis* (Table 2). The results also indicated that both ethanol and methanol extracts of all mushroom samples with different volumes demonstrated antimicrobial activities against test microorganisms at varying levels.

In their 2020 study, Canlı et al. observed a significant positive correlation between the antimicrobial efficacy of *L. leucothites* extracts and the volume of extract utilized. With inhibitory zones of 7 mm, 50 µL ethanol extract of *Leucothites* exhibited antibacterial activity against most of the test microorganisms, including *P. aeruginosa* and *E. coli*. With inhibition zones of either 7 or 10 mm, 70 µL ethanol extract of *L. leucothites* shown antibacterial efficacy against pathogen microorganisms. The 180 µL ethanol extract, equivalent to 58.50 mg/mL extract, showed the highest activity against *S. infantis* (10 mm inhibition zone) and *E. coli* (11 mm inhibition zone). It can be postulated that an increase in the volume of the extracted material may result in an enhancement of the observed activity. Purifying the active compound and utilizing it against microorganisms would demonstrate better activities. In this context, our results are comparable to those of previous studies which indicated the antimicrobial

activity of *L. leucothites*. It has been reported that the antimicrobial activity levels of fungal organisms are due to secondary metabolism products (Calvo et al., 2002). So, additional experiments are required for a better understanding of the mode of action of active substances in detail.

In another study, the antimicrobial activity of extracts prepared from three different fungi using three different solvents was tested against different pathogenic species. Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923 and *E. faecalis* ATCC 29212), Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922), and one fungal species (*C. albicans* ATCC 10231) were used as test microorganisms. Ethanol extracts of *G. lucidum* and *C. micaceus* were more effective than the extracts prepared with other solvents. Although the antimicrobial activity of ethanol and chloroform extracts against the test microorganisms was determined at different levels using both disc diffusion and agar-well diffusion methods, it was much lower in distilled water extracts of *L. edodes* (Avci et al., 2014). It was also stated that *C. micaceus* ethanol extract showed minimum inhibition against *E. faecalis* ATCC 29212 with 6.0 mm zone diameter while highest inhibition was demonstrated against *P. aeruginosa* ATCC 27853 with a zone diameter of 11.0 mm.

In a study in which nutritional values, hydrophilic and lipophilic compound contents, and biological activities of four different *Agaricus* sp. (*Agaricus bitorquis*, *A. bisporus*, *A. macrosporus* and *A. campestris*) were evaluated, ethanolic extracts of all investigated fungal samples exhibited higher antibacterial activity than methanolic ones, except for *L. monocytogenes*. The best antibacterial effect was obtained with *A. macrosporus* extracts against all bacteria, except *L. monocytogenes*, while *A. bitorquis* extracts showed the strongest effect against this bacterium. The antibacterial activity of the extracts was found to be lower than the antibiotics used as control (Glamočlija et al., 2015).

Fatty Acid Compositions

Although mushrooms are known to contain low amounts of fats, having high essential fatty acids and high protein, vitamin, and mineral content, they are regarded as healthy food sources for the human diet.

In this context, the fatty acid composition of the four mushroom samples was investigated using GC-MS. The majority of the fatty acids in the mushroom samples were found to be unsaturated, as shown in Table 3. Linoleic acid was one of the major unsaturated fatty acids, with 42.96; 39.07; 28.98 and 23.58% in *A. bitorquis*, *L. leucothites*, *C. micaceus* and *C. atramentaria*, respectively. Another major unsaturated fatty acid was oleic acid, with 34.65; 6.82; 6.37 and 3.65% in *C. atramentaria*, *C. micaceus*, *L. leucothites* and *A. bitorquis*, respectively. The beneficial effects of unsaturated fatty acids in the human diet are well

documented (Barcelli et al., 1986; Kang and Leaf, 1996; López-Miranda et al., 2006; Yang et al., 2022).

Palmitic acid was one of the primary saturated fatty acids found in the mushroom samples, with 11.54; 11.13; 10.13; and 9.97% in *C. atramentaria*, *A. bitorquis*, *C. micaceus* and *L. leucothites*, respectively. Another saturated fatty acid was stearic acid, with 39.51; 31.26; 16.19 and 16.93% of the fatty acid found in *C. micaceus*, *L. leucothites*, *A. bitorquis* and *C. atramentaria*, respectively. Lauric, myristic, and palmitic fatty acids are considered to be responsible for the increase in plasma LDL cholesterol (Williams, 2000), while it was reported that stearic acid did not affect the increase of the total cholesterol or LDL cholesterol concentrations (Bonanome and Grundy, 1988).

Table-3. Fatty acid composition of mushroom species.

No	Compound	RT(min)	MW+CF	<i>A. bitorquis</i>		<i>C. atramentaria</i>		<i>C. micaceus</i>		<i>L. leucothites</i>	
				Con.	SI	Con.	SI	Con.	SI	Con.	SI
1	Phthalic acid, diethyl ester	26.796	222 (C12H14O4)	5.25	98	0.77	98	2.11	97	1.46	97
2	Myristic acid, methyl ester	30.927	242 (C15H30O2)	0.38	89	0.15	88	nd		0.32	87
3	Pentadecanoic acid, methyl ester	33.724	256 (C16H32O2)	0.37	96	0.37	97	nd		0.31	94
4	Palmitoleic acid, methyl ester	35.725	268 (C17H32O2)	nd		0.33	95	0.41	91	0.25	91
5	Palmitic acid methyl ester	36.238	270 (C17H34O2)	11.13	98	11.54	98	10.13	98	9.97	98
6	3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenepropanoic acid methyl ester	36.677	292 (C18H28O3)	1.86	86	0.77	86	2.5	85	2.53	85
7	Margaric acid, methyl ester	38.513	284 (C18H36O2)	1.25	96	nd		nd		nd	
8	Linoleic acid, methyl ester	39.968	294 (C19H34O2)	42.96	96	23.58	97	28.98	97	39.07	97
9	Oleic acid, methyl ester	40.084	296 (C19H36O2)	3.65	97	34.65	96	6.82	96	6.37	96
10	11-Octadecenoic acid, methyl ester	40.2	296 (C19H36O2)	0.59	93	2.58	97	0.54	90	0.39	89
11	Stearic acid, methyl ester	40.62	298 (C19H38O2)	26.19	96	16.93	96	39.51	96	31.26	96
12	Linoleic acid, ethyl ester	41.314	308 (C20H36O2)	0.52	94	0.47	93	0.43	87	1.4	94
13	Oleic acid, ethyl ester	41.428	320 (C20H38O2)	nd		0.45	93	nd		nd	
14	Stearic acid, ethyl ester	41.938	312 (C20H40O2)	0.26	92	nd		nd		nd	
15	Hexadecadienoic acid, methyl ester	43.449	266 (C17H30O2)	nd		0.45	85	nd		nd	
16	Arachidic acid methyl ester	44.419	326 (C21H42O2)	1.16	95	0.63	84	0.81	91	0.5	93
17	Linolenic acid, methyl ester	44.66	292 (C19H32O2)	nd		0.23	80	nd		nd	
18	Behenic acid, methyl ester	48.083	354 (C23H46O2)	0.42	94	0.19	94	0.3	87	nd	

RT: Retention Time, MW: Molecular weight, CF: Chemical formula, Con.: Concentration (%), SI.: Similarity Index (%), nd: not detected

Conclusion

In this study molecular identification, amount of total phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities, and fatty acid composition of four Agaric mushroom species were investigated. Among these samples, *A. bitorquis* exhibited significant antioxidant and antimicrobial activity. GC-MS analyses also showed that this mushroom was mostly rich in unsaturated fatty acids regarded as healthy components of the human diet. The findings of this study suggest that this mushroom may be considered as a valuable natural food source that should be widely promoted. Additional research into the chemical properties of the oxidative components and phytochemicals in the extracts is recommended for developing mushrooms in the industry, given the documented antioxidant activity of the mushroom extracts.

Declarations

Acknowledgement

This study was funded by the Niğde Ömer Halisdemir University Research Projects Unit under Grant No. FEB 2018/18. The authors would like to thank them for their support.

References

- Akata, I., Ergönül, B., & Kalyoncu, F. (2012). Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8(2), 134-138. <http://scialert.net/fulltext/?doi=ijp.2012.134.138&org=11>
- Akata, I., Zengin, G., Picot, C. M. N., & Mahomoodally, M. F. (2019). Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. *South African Journal of Botany*, 120, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.008>
- Avci, E., Avci, G. A., & Kose, D. A. (2014). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of medically important mushrooms using different solvents and chemical composition via GC/MS analyses. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(8), 429-434. <https://doi.org/10.12691/jfmr-2-8-1>
- Aytar, E. C., Akata, I., & Acik, L. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of *Armillaria mellea* and *Macrolepiota procera* extracts. *Mantar Dergisi*, 11(2), 121-128.
- Badalyan, S.M., Barkhudaryan, A., & Rapior, S. (2019). Recent progress in research on the pharmacological potential of mushrooms and prospects for their clinical application. *Medicinal Mushrooms*, 1-70. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6382-5_1
- Bal, C., Akgül, H., & Sevindik, M. (2019). The Antioxidant potential of ethanolic extract of edible mushroom *Lycoperdon molle Pers.* (Agaricomycetes). *Eurasian Journal of Forest Science*, 7(3), 277-283. <https://doi.org/10.31195/ejefjs.591432>
- Barcelli, U. O., Miyata, J., Ito, Y., Gallon, L., Laskarzewski, P., Weiss, M., Hitzemann, R., & Pollak, V. E. (1986). Beneficial effects of polyunsaturated fatty acids in partially nephrectomized rats. *Prostaglandins*, 32(2), 211-219. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(86\)90126-7](https://doi.org/10.1016/0090-6980(86)90126-7)
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bonanome, A., & Grundy, S. M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England Journal of Medicine*, 318(19), 1244-1248. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805123181905>
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1986). *Fungi of Switzerland*, vol. 2. Non-gilled fungi, Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gasteromycetes. Verlag Mykologia. Lucerna, Switzerland.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3). <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.447-459.2002>
- Canlı, K., Akata, I., Yetgin, A., Benek, A., & Altuner, E. M. (2020). In vitro antimicrobial activity screening of leucoagaricus leucothites and determination of the ethanol extract composition by gas chromatography/mass spectrometry. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(2), 1250-1257. <https://doi.org/10.29130/dubited.642707>
- Canpolat, Ş., & İşlek, C. (2023). The effect of arbuscular mycorrhiza on physiological and biochemical parameters and capsaicinoid production in *Capsicum annum L.*: A comparative study of extraction methods and solvents. *Archives of Biological Sciences*, 75(3), 327-339. <https://doi.org/10.2298/ABS230601027C>
- Canpolat, Ş., Akata, I., İşlek, Y., Canpolat, E., & İşlek, C. (2021). Total Phenolics, Antioxidative and Antimicrobial Activities of Some Edible Ascomycota Collected from Niğde. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(10), 1915-1920. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i10.1915-1920.4642>
- Davies, S.C., Fowler, T., Watson, J., Livermore, D.M., & Walker, D. (2013). Annual report of the chief medical officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet* 381,1606-1609, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60604-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60604-2).
- Dogan, H.H., Duman, R., Özkalp, B., & Aydin, S. (2013). Antimicrobial activities of some mushrooms in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 51(6), 707-711. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.764327>
- Dubost, N.J., Ou, B., & Beelman, R.B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.030>
- Düşgün, C., Kankılıç, T., İşlek, C., Bal, D. F., & Kankılıç, Ö. (2021). Antioxidant and Cytotoxic Potential of Local Endemic Plant *Pastinaca zozimoides Fenzl.* *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(4), 646-649. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i4.646-649.3715>
- Emsen, B., & Guven, B. (2020). Activities of two edible macrofungi, *Coprinus comatus* and *Leucoagaricus leucothites* in human lymphocytes: cytogenetic and biochemical study. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(3), 361-368. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1612479>
- Gan, C.H., Amira, N.B., & Asmah, R. (2013). Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*). *International Food Research Journal*, 20(3), 1095-1102.
- Gașeckă, M., Magdziak, Z., Siwulski, M., & Mleczek, M. (2018). Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties, and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *European Food Research and Technology*, 244, 259-268. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2952-9>
- Giusti, A., Ricci, E., Gasperetti, L., Galgani, M., Polidori, L., Verdigi, F., Narducci, R., & Armani, A. (2021). Molecular identification of mushroom species in Italy: An ongoing project aimed at reinforcing the control measures of an increasingly appreciated sustainable food. *Sustainability*, 13(1), 238(1-8). <https://doi.org/10.3390/su13010238>

- Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Reis, F. S., Barros, L., Ferreira, I.C. F. R., & Soković, M. (2015). A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. *Food & function*, 6(6), 1900-1910. <https://doi.org/10.1039/C4FO01135J>
- Günç Ergönül, P., Akata, I., Kalyoncu, F., & Ergönül, B. (2013). Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2013/163964>
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2012). Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from Northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4634-4640. <https://doi.org/10.1021/jf300739m>
- Heleno, S.A., Ferreira, R.C., Antonio, A.L., Queiroz, M.J.R.P., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R (2015). Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, 11, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.006>
- Hibbett, D., Abarenkov, K., Kõljalg, U., Öpik, M., Chai, B., Cole, J., & Geiser, D. M. (2016). Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*, 108(6), 1049-1068. <https://doi.org/10.3852/16-130>
- Kang, J. X., & Leaf, A. (1996). Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids: recent studies. *Circulation*, 94(7), 1774-1780. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.7.1774>
- Kaya, M., Berktaş, S., Adanacioğlu, N., & Çam, M. (2021). Determination of total phenolic content, antioxidant activity and eritadenine compound of wild mushrooms in Kayseri region and cultivated medicinal mushrooms. *GIDA-Journal of Food*, 46(2), 376-395. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21007>
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J., Ro, H.M., & Chung, I.M. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J Agric Food Chem*, 56(16):7265–7270. <https://doi.org/10.1021/jf8008553>
- Larsson, D. G., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H., & Jülich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(3), 285-299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- López-Miranda, J., Pérez-Martínez, P., & Pérez-Jiménez, F. (2006). Health benefits of monounsaturated fatty acids. In *Improving the fat content of foods*, 71-106. <https://doi.org/10.1533/9781845691073.1.71>
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., ... & Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. *IMA fungus*, 11(1), 1-32. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146-1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>
- Nilsson, R.H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Özdal, M., Gülmez, Ö., Özdal, Ö. G., & Algur, Ö. F. (2019). Antibacterial and antioxidant activity of mycelial extracts of different *Pleurotus* species. *Food and Health*, 5(1), 12-18.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., & Guillamón, E. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.085>
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130(2), 394-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.057>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Redhead, S. A., Vilgalys, R., Moncalvo, J. M., Johnson, J., & Hopple Jr, J. S. (2001). *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon*, 50(1), 203–241. <https://doi.org/10.2307/1224525>
- Ribeiro, B., de Pinho, P. G., Andrade, P. B., Baptista, P., & Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.04.005>
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2001). Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7. <https://doi.org/10.1038/ngp.els.0003894>
- Saridogan, B. G. O., Islek, C., Baba, H., Akata, I., & Sevindik, M. (2021). Antioxidant antimicrobial oxidant and elements contents of *Xylaria polymorpha* and *X. hypoxylon* (Xylariaceae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(5), 5400-5404.
- Salter, A. M. (2013). Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal*, 7, 163-171. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002023>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & White, M. M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Selem, E., Alp, Y., Sensoy, S., Uzun, Y., Cavusoglu, S., Karatas, N., ... & Szopa, A. (2021). Biochemical and morphological characteristics of some macrofungi grown naturally. *Journal of Fungi*, 7(10), 851. <https://doi.org/10.3390/jof7100851>
- Sevindik, M., & Bal, C. (2021). Antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of wild mushroom, *Laeticutis cristata* (Agaricomycetes), from Turkey. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 23(11), 85-90. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021040415>
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Species Fungorum, <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>, 07 October 2022.

- Taviano, M. F., Filocamo, A., Ragusa, S., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., ... & Miceli, N. (2018). Phenolic profile, antioxidant, and cytotoxic properties of polar extracts from leaves and flowers of *Isatis tinctoria* L.(Brassicaceae) growing in Sicily. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(4), 795-803. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1338629>
- Tsai, S.Z., Tsai, H.L., & Mau, J.L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT Food Science and Technology*, 40, 1392–1402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.10.001>
- Wasser, S. P. (1977). New and rare species of Agaricaceae Cohn. family. *Ukr Bot Zh.*
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.
- Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. In *Annales de zootechnie* (Vol. 49). EDP Sciences.
- Yang, L., Yang, C., Chu, C., Wan, M., Xu, D., Pan, D., Xia, H., Wang, S.K., Shu, G., Chen, S., & Sun, G. (2022). Beneficial effects of monounsaturated fatty acid-rich blended oils with an appropriate polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and a low n-6/n-3 fatty acid ratio on the health of rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 7172-7185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12083>
- Yilmaz, N., Türkekul, I., Bulut, S., & Sahin, F. (2013). Fatty acid composition in ten mushroom species collected from Turkey's middle black sea region. *Asian Journal of Chemistry*, 25(3), 1216-1220.



In-vitro Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles Produced by Hydrothermal Method Against Some Foodborne Pathogens

Pınar Karatepe^{1,a,*}, Müzeyyen Akgöl^{1,b}, Sinem Bayrak^{1,c}, Gökhan Kürşad İncili^{1,d}

¹Food Hygiene and Technology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Fırat University, 23119, Elazığ, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 13.07.2024
Accepted : 26.08.2024

Keywords:

ZnO
Nanoparticle
Antimicrobial activity
Foodborne pathogens
Characterization

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) are synthesized via a multitude of techniques, resulting in nanoparticles of varying sizes and morphologies that directly influence their antimicrobial efficacy. The objective of this study is to ascertain the particle size and morphology of ZnO-NPs synthesised via the hydrothermal method and to evaluate their *in vitro* antibacterial effects against *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes*, which are important foodborne pathogens. The ZnO-NPs were examined using a scanning electron microscope (SEM). Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and the diameter of inhibition zones were measured against these pathogenic bacteria. The SEM images revealed that the ZnO-NPs exhibited a uniform distribution, with particle sizes ranging between 23 and 25 nm. The MIC and MBC values against the tested strains were found to range from 20.83 to 41.67 µg/mL and between 66.67- 83.33 µg/mL, respectively. In addition, the diameter of inhibition zones were ranged from 15.16 to 16.96 mm. The findings of the study demonstrated that ZnO-NPs synthesized via the hydrothermal method exhibited antibacterial effects against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In conclusion, the use of ZnO-NPs can facilitate the improvement of the microbiological quality of foods by the inhibition of foodborne pathogens.

^a pkaratepe@firat.edu.tr
^c bayantar58@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-4698-9104>
^d <https://orcid.org/0009-0007-4988-3368>

^b makgol@firat.edu.tr <https://orcid.org/0000-0002-8926-4509>
^d gkincili@firat.edu.tr <https://orcid.org/0000-0003-1178-3365>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Nanotechnology represents a promising domain of technological advancement with a considerable influence on human well-being and social conditions (He et al., 2019). The advent of nanotechnology has given rise to a multitude of pioneering developments across a spectrum of areas, including pharmacy, medical sciences, agriculture, food preservation, textiles, and environmental and energy resources (Adeyemi & Fowel, 2023; AL-Tamimi, 2021). Furthermore, the fields of nanoscience and nanotechnology have assumed to play a prominent role in food science research, largely due to their profound impact on the overall preservation and safety of food products (Leta et al., 2024). For instance, the incorporation of nanomaterials into food packaging has a potential to facilitate a profound transformation in the manner by which food is stored, transported, and consumed. This is an emerging area that provides solutions to improve food safety, prolonging shelf life, and mitigate environmental impact (Gupta et al., 2024). This technology focuses on developing and utilizing new edible materials at the nanoscale, collectively known as nanoparticles. Nanoparticles, defined as materials with

dimensions ranging from 1 to 100 nm, possess distinctive chemical and physical properties that render them suitable for a wide range of applications (Leta et al., 2024). Specifically, nanoparticles are extensively used in the production of food packaging materials due to their antimicrobial properties. These properties allow them to effectively inhibit the growth of different microorganisms, including bacteria, yeasts, molds, and specific pathogens such as *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, and *Lactobacillus plantarum* (Gur et al., 2022; Leta et al., 2024; Rout & Pradhan, 2024). It is also well documented that NPs with antimicrobial and antioxidant properties may assist in maintaining the aroma and flavor of foodstuffs by inhibiting or retarding the microbiological and oxidative deterioration of foods. (Berekaa, 2015).

NPs are generally divided into two main categories based on their fundamental properties as follows: organic and inorganic NPs. Inorganic NPs, including CuO-, ZnO-, TiO₂-, Ag-, and Au-NPs, have been extensively used in

food technology, particularly in edible films. Incorporating these materials in packaging has a potential to improve the physicochemical and functional properties of foods (Gupta et al., 2024; Kevenk & Aras, 2022).

Metal and metal oxide NPs, including silver, aluminum oxide, iron oxide, silica oxide, titanium oxide, zinc oxide, and copper oxide, have garnered attention in recent years due to their exceptional physicochemical properties, including stability and antimicrobial effects (Gur et al., 2022). In this context, ZnO is a highly versatile material with a range of physicochemical properties, including mechanical, electrical, optical, magnetic, catalytic, and strong piezoelectric and pyroelectric characteristics. ZnO has been employed in a number of different applications, including the manufacture of electronic devices, the packaging of food products, the treatment of wastewater, and the development of biomedical technologies including drug delivery systems, as well as anticancer, antibacterial, and antidiabetic activities (Jamdagni et al., 2018; Phatak et al., 2024).

ZnO nanoparticles are classified as inorganic NPs and have gained a significant attention from researchers due to their outstanding properties, which include low toxicity, physicochemical characteristics, and environmental friendly behavior. In recent years, ZnO-NPs have been assigned as Generally Recognized as Safe (GRAS) products under 21CFR182.8991 by the United States Food and Drug Administration (FDA) (Rout & Pradhan, 2024).

The nanostructure of ZnO has been found to demonstrate antibacterial effects through the generation of Zn²⁺ ions within microbial environments. The release of these ions disrupts amino acid metabolism and enzyme systems in microorganisms. The release of Zn²⁺ is primarily influenced by two main factors: (1) the physicochemical properties of the particles, including size, porosity, concentration, and morphology; (2) environmental conditions like pH, duration of exposure, and the presence of additives (Gupta et al., 2024). In this context, Dutta et al. (2012) reported that ZnO-NPs exhibited antibacterial properties by generating reactive oxygen species (ROS) in the culture media which induced the peroxidation of the lipid membrane of the microorganisms.

The synthesis of ZnO-NPs can be achieved through a number of different physical or chemical methods. A variety of techniques have been employed for the synthesis of ZnO-NPs, including ball milling, laser ablation, chemical and physical vapour deposition, ion implantation, electron beam evaporation, and thermal evaporation. Physical techniques like laser ablation yield ZnO with a consistent shape, while ball milling provides a cost-efficient method for producing nanocrystalline ZnO powder. Nevertheless, physical methods pose several challenges, such as requiring high pressure and temperature, involving high equipment costs, and presenting difficulties in controlling synthesis parameters. Chemical methods, such as solvothermal, hydrothermal, precipitation, sol-gel, sonochemical, polyol, and chemical reduction methods, have been developed for the synthesis of ZnO nanoparticles as well (Nawaz et al., 2024).

In line with the advancement of knowledge in the field of hygiene over the past decade, the significance of nanoparticles has grown on a global scale. NPs have begun

to emerge in numerous contexts as a novel, efficacious, and supplementary instrument in the battle against zoonotic diseases, one of the most pressing public health concerns in the present era (Deshmukh et al., 2019). According to the World Health Organization (WHO), about 600 million cases of foodborne illness and 420,000 deaths are linked to foodborne pathogens each year. As indicated in the 2022 zoonoses report published by the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *E. coli*, and *L. monocytogenes* are among the five most prevalent zoonotic agents affect humans (EFSA & ECDC, 2022). It is therefore of the utmost importance to address foodborne illnesses caused by foodborne pathogens. (Leta et al., 2024).

Interest in NPs significantly increased only in the latter half of the 20th century, primarily due to the prior absence of technologies capable of accurately evaluating their antimicrobial and physicochemical properties. As a consequence of scientific developments, there has been a considerable increase in research activity over the past two decades. However, as previously stated, the NPs synthesized via different approaches may have undergone alterations in their bioactive properties, including the antimicrobial effect. Therefore, there is still need to evaluate the antimicrobial activity of the NPs produced by different methodologies. In this regard, the study aims to identify the particle size and morphology ZnO-NPs by produced hydrothermal methodology and investigation of its *in-vitro* antimicrobial effect against major foodborne pathogenic strains, including *L. monocytogenes* (ATCC 13932), *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) and *S. Typhimurium* (ATCC 14028).

Materials and Methods

Synthesis of ZnO-NPs

NPs were produced via the hydrothermal methodology. Briefly, 4 g of zinc acetate were dissolved in 60 mL of double-distilled water. Then, 2 M NaOH was added to the solution until the pH reached 13.0. The resulting mixture was then homogenised for 15 min via ultrasonication. Subsequently, the mixture was transferred to a teflon vessel within the Fytronix Nanomaterial Production Device (Fytronix Corp, Türkiye) where it was heated to 180 °C for 8 h. Following this, the resulting mixture was subjected to filtration and washing three times with double-distilled water. It was then placed in a petri plates and dried for 12 h at 80°C in a vacuum oven (Erol et al., 2022).

Scanning Electron Microscopy

The ZnO-NPs was characterised by taking SEM images. The analyses were carried out at the Yuzuncu Yil University Scientific Application and Research Centre (Van/Türkiye). The ZnO-NPs were examined in terms of shapes and size distributions (SEM; ZEISS Sigma 300, 10 kV, 100.00 K \times magnification). The images were used to gather detailed information about the particle sizes and distributions of the NPs.

In Vitro Antibacterial Activity

The *in-vitro* antimicrobial activity tests were conducted on the day of the synthesis of ZnO-NPs against three

pathogens: *L. monocytogenes* (ATCC 13932), *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150), and *S. Typhimurium* (ATCC 14028). For this purpose, measuring the diameter of the inhibition zones, MIC and MBC tests were performed. In the inhibition zones assay, the disc diffusion method was employed, and the diameters of the zones were measured. In brief, 100 μ L of inoculum of the tested pathogens with a concentration of 6.0 log₁₀ CFU/mL were spread on Mueller-Hinton agar. After a five-minute incubation period at ambient temperature to allow for microbial adherence, a solution of ZnO-NPs at a concentration of 400 μ g/mL (20 μ L) was added to the plates and the plates incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, the diameters of inhibition zones were measured with digital callipers (Moradi et al., 2019). MIC values were determined through the broth dilution method. A solution of ZnO-NPs at a concentration of 200 μ g/mL was prepared in Tryptic Soy Broth, and two-fold serial dilutions were subsequently prepared with the same broth. A 100 μ L of pathogenic bacteria inoculum at a concentration of 6.0 log₁₀ CFU/mL was added to the tubes. Following incubation period (37 °C for 24 h), the MIC was identified as the lowest concentration of ZnO-NPs with no visible bacterial growth. The MBC value was then determined following the MIC assay. Briefly, 10- μ L from each tube containing concentrations of MIC to MIC \times 8 were spread onto MHA plates. After 24 hours of incubation at 37 °C, the minimum concentration that completely inhibited the tested strains was determined as the MBC value (CLSI, 2017).

Statistical Analyses

In the present study, data were obtained from three independent replicates. The statistical analyses were conducted using the SPSS software, version 21.0. All data sets were presented as mean \pm standard deviation, and a p-value of 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

As shown in Figure 1, the SEM image revealed that the particle size ranges between 23 and 25 nm. The particle sizes of the synthesized NPs provided an evidence that nanoparticles were successfully synthesized via the hydrothermal method. Consistently, Donmez and Keyvan (2023) found that the particle size of the ZnO-NPs produced by grape seed extract via green synthesis process was found to be 15.86 nm. In another study conducted by Alizadeh-Sani et al. (2020), the mean diameter of ZnO-NPs was found to be approximately 20 nm. The ZnO-NPs particle sizes obtained by the researchers are comparable to those observed in our current study. In addition, the results indicate that the using of different techniques exerts a profound influence on the characteristics of the NPs. This may lead to alterations in their structural and physicochemical properties, which could potentially change their antimicrobial efficacy due to increased accessibility to microorganisms.

It is well-established that one of the principal antimicrobial mechanisms of NPs is the generation of reactive oxygen species (ROS), which results in oxidative stress in microbial cells. NPs produce a range of ROS types, including superoxide radicals (O₂⁻), hydroxyl radicals (OH \cdot), hydrogen peroxide (H₂O₂), and singlet

oxygen (¹O₂), by reducing oxygen molecules through redox potential. Oxidative stress plays a crucial role in the destruction of bacterial cells, whereby membrane permeability is compromised. The results of recent researches indicate that oxidative stress leads to DNA damage, apoptosis of bacterial cells, deactivation of proteins, and disruption of enzymatic activities in the periplasm which are crucial for maintaining bacterial morphology and physiological functions (Rout & Pradhan, 2024). In the current study, *in-vitro* antimicrobial tests indicated that the MIC and MBC values of the ZnO-NPs against the tested pathogens were found to be ranged between 20.83 to 41.67, and 66.67 to 83.33 μ g/mL, respectively, (Table 1). In addition, the diameter of the inhibition zones exhibited a range of 15.16 to 16.96 mm. The MIC value of the ZnO-NPs against *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* were found to be lower than that of *L. monocytogenes*. The lowest MBC value was observed for *E. coli* O157:H7. Besides, inhibition zone of ZnO-NPs against *L. monocytogenes* was found to be larger than that of the other two pathogens. Pauzi et al. (2021), observed that the diameter of the inhibition zone of ZnO-NPs synthesized using gum arabic against *E. coli* (1.4 \pm 0.09 cm) was comparable to the findings of our study. Hamk et al. (2023), reported that the diameter of the inhibition zone of ZnO-NPs produced by green synthesis from *Bacillus subtilis* ranged from 12 to 13.3 mm against Gram-negative bacteria. For Gram-positive microorganisms, these values were determined to be 11 to 12 mm. The same researchers documented that the MIC value of the ZnO-NPs against *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* was found to be 2.0, 1.0, and 1.0 mg/mL respectively. In another study, the MIC values of NPs produced from Fennel Seeds Extract were determined as 32.00 μ g/mL for *S. aureus*, *S. Typhimurium*, and *Cryptococcus* sp., and 64.00 μ g/mL for *P. aeruginosa* (AlSalhi et al., 2020). El-Fallal et al. (2023), investigated the antibacterial effect of ZnO-NPs produced by kombucha extract. They reported that the MIC value exhibited variability againsts tested pathogenic strains, with values of 25, 30, and 40 μ g/mL against *E. coli*, *S. aureus*, and *Klebsiella pneumoniae*, respectively. The zone of inhibition was observed to increase in conjunction with an increase in NPs concentration, indicating a positive correlation between the two variables. At a concentration of 50 μ g/mL, the zone of inhibition was observed to be 25 for *E. coli*, while at a concentration of 150 μ g/mL, the zone of inhibition was 32 mm. The MIC of the ZnO-NPs produced by green synthesis from grape seed extract against *S. aureus* was determined as 62.5 μ g/mL in a study conducted by Donmez and Keyvan (2023). Alizadeh-Sani et al. (2020), reported that the MIC value of ZnO-NPs was found to be 2.5 and 3 mg/mL for *E. coli* and *S. Enteritidis* and 2.0 and 1.5 mg/mL for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively.

In the present study, the MBC values of ZnO-NPs were found to be approximately two times higher than the MIC value against *L. monocytogenes*, three times for *E. coli* and four times for *S. Typhimurium*. A review of the literature reveals that ZnO-NPs has been demonstrated to possess a potent bactericidal effect by numerous researchers (Arayesh et al., 2023; de Souza et al., 2019; El-Fallal et al., 2023).

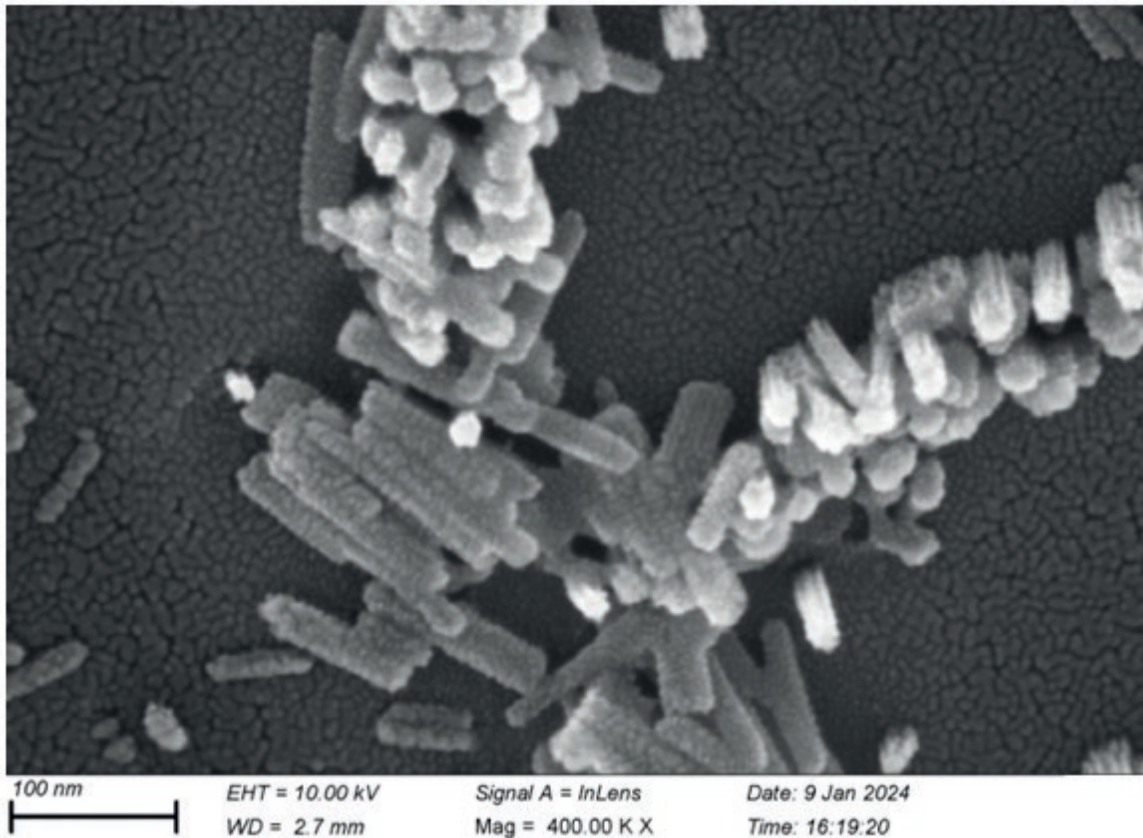


Figure 1. SEM image of the ZnO-NPs produced by hydrothermal method (Magnification was 400,000, and the length of bar is 100 nm).

Table 1. The minimum inhibitory concentrations (MIC), minimum bactericidal concentrations (MBC) and inhibition zone diameters of ZnO-NPs against some major foodborne pathogens (mean ± SD).

	MIC value (µg/mL)	MBC value (µg/mL)	Inhibition zone (mm)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	41.67 ± 14.43	83.33 ± 28.87	16.96 ± 0.61
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	20.83 ± 7.22	66.67 ± 28.87	15.16 ± 0.32
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	20.83 ± 7.72	83.33 ± 28.87	15.77 ± 0.31

ZnO-NPs exhibited a pronounced antimicrobial impact against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Akbar et al., 2019). Nevertheless, the ZnO-NPs used in the current study demonstrated superior antibacterial efficacy against Gram-negative bacteria in comparison to the Gram-positive bacteria. The results of this study align with those of Priyadarshi et al. (2021), who observed a greater antimicrobial activity in *E. coli* compared to *L. monocytogenes*, and Nandhini et al. (2024), who found a higher antimicrobial activity in *E. coli* compared to *S. aureus*. Roy et. al (2021), emphasised that the possible reason for this is due to the difference in the cell wall structure of microorganisms. It is well known that the cell wall of Gram-positive bacteria has a thicker peptidoglycan layer than that of Gram-negative strains, which may limit the penetration of ZnO-NPs into the cell (Hamk et al., 2023). This may explain the higher susceptibility of Gram-negative strains in comparison to the Gram-positive ones against NPs.

The antibacterial activity of metal oxide NPs is influenced by several factors, such as size, surface area to volume ratio, crystalline structure, and surface chemistry. Additionally, the shape of NPs plays a role in their antibacterial effectiveness and mode of action. This shape-

related activity is often linked to the interaction between NPs and cell wall surfaces. NPs with a high aspect ratio, having their long axes parallel to the bacterial membrane, exhibit increased surface attachment. Thus, the antibacterial activity of NPs is indirectly related to their surface area. Another important factor is the size of the NPs. NPs with smaller nanoparticles demonstrate superior antibacterial activity compared to bulk materials, as they can more effectively cover the bacterial surface (Karakaplan, 2021; Ba-Abdad et al., 2017). Differences in the results of the aforementioned studies may be due to variations in production methods, particle size and shape, susceptibility of tested strains, and analysis methods.

On the other hand, potential adverse effects such as safety concerns have been associated with the increasing use of engineered NPs in food industry. The intake of NPs may exhibit an adverse effect on effects gastrointestinal microflora. Furthermore, they absorption of the NPs in gastrointestinal tract may effect different organs and body systems. Therefore, the toxicity, risk assessment, clinical approval, and consumer adaptability of the NPs are still need for further investigation. Further research is required to address these knowledge gaps and to develop a safe and non-toxic NPs for food industry.

Conclusion

The SEM image demonstrated that the nanoparticles had been successfully synthesized by hydrothermal method. It was established that ZnO-NPs with a particle size range of 23 to 25 nm exhibited a pronounced antimicrobial effect against the tested pathogens. It was concluded that the antimicrobial activity of the ZnO-NP was higher in *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* compared to *L. monocytogenes* in terms of MIC value. At the MBC value, which represents the dose required for complete microbial eradication, the highest effect (lowest dose) was observed in *E. coli* O157:H7. In terms of zone of inhibition, the most pronounced antibacterial effect was recorded in *L. monocytogenes*. It is thought that NPs produced via the hydrothermal method can be used as an antibacterial agent to enhance the microbiological quality of foods, due to their pronounced antibacterial properties. However, despite the promising potential of NPs, scalability issues, lack of standard methodologies, and toxicity related to nanoparticle migration also raise concerns. In order to address the current limitations in the widespread adoption of NPs in food preservation technology, detailed interdisciplinary studies in the fields of food science and environmental management are needed to achieve standardized synthesis approaches, characterization of nanoparticle-based additives, safety assessment, and compliance with appropriate labeling requirements and standards for consumer awareness.

Declarations

Ethical Approval

Ethical approval is not required.

References

- Adeyemi, J. O., & Fawole, O. A. (2023). Metal-based nanoparticles in food packaging and coating technologies: A review. *Biomolecules*, 13(7), 1092. <https://doi.org/10.3390/biom13071092>
- Akbar, A., Sadiq, M. B., Ali, I., Muhammad, N., Rehman, Z., Khang, M. N., Muhammad, J., Khan, S. A., Rehman, F. U., Anal, A. K. (2019). Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.005>
- Alizadeh-Sani, M., Hamishehkar, H., Khezerlou, A., Maleki, M., Azizi-Lalabadi, M., Bagheri, V., Safaei, P., Azimi, T., Hashemi, M., & Ehsani, A. (2020). Kinetics Analysis and Susceptibility Coefficient of the Pathogenic Bacteria by Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(1), 56–64. doi: 10.15171/apb.2020.007 <https://apb.tbzmed.ac.ir>
- AlSalthi, M. S., Devanesan, S., Atif, M., AlQahtani, W. S., Nicoletti, M., & Serrone, P. D. (2020). Therapeutic Potential Assessment of Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Derived from Fennel Seeds Extract. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8045–8057. <http://doi.org/10.2147/IJN.S272734>
- AL-Tamimi, B. Y. H. (2021). Green synthesis of zinc and nickel oxides nanoparticles and study of their biological applications [Master's thesis, University of Anbar].
- Arayesh, M. A., Kianfar, A. H., & Mohammadnezhad, G. (2023). Synthesis of Fe₃O₄/ZrO₂/ZnO nanoparticle for enhancing visible light photocatalytic and antibacterial activity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 153, 105213. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105213>
- Ba-Abbad, M. M., Takriff, M. S., Benamor, A., Mahmoudi, E., & Mohammad, A.W. (2017). Arabic gum as green agent for ZnO nanoparticles synthesis: properties, mechanism and antibacterial activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28, 12100–12107. <https://doi.org/10.1007/s10854-017-7023-2>
- Berekaa, M. M. (2015). Nanotechnology in food industry; advances in food processing, packaging and food safety. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 345–357. <https://www.researchgate.net/publication/306017224>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA, 2017; online: <https://www.dbt.univr.it/documenti/OccorrenzaIns/matdid/matdid485539.pdf>
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering*, 97, 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
- de Souza, R. C., Haberbeck, L. U., Riella, H. G., Ribeiro, D. H. B., & Carciofi, B. A. M. (2019). Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by solothermal process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36, 885–893. [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180027](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180027)
- Donmez, S., & Keyvan, E. (2023). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using grape seed extract and evaluation of their antibacterial and antioxidant activities. *Inorganic and Nano-Chemistry*, <https://doi.org/10.1080/24701556.2023.2165687>
- Dutta, R. K., Nenavathu, B. P., Gangishetty, M. K., & Reddy, A. V. R. (2012). Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 143–50. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.046>
- EFSA & ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2022). The European Union one health 2021 zoonoses report. *EFSA Journal*, 20(12), 7666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- El-Fallal, A. A., Elfayoumy, R. A., & El-Zahed, M. M. (2023). Antibacterial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles using Kombucha extract. *SN Applied Sciences*, 5, 332. <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05546-x>
- Erol, I., Al-Sehemi, A. G., Tataroğlu, A., Dere, A., Al-Ghamdi, A. A., & Yakuphanoglu, F. (2022). Hydrothermal Synthesis of ZnO-Doped Poly-2-(4-Fluorophenyl)-2-Oxoethyl-2-Methylprop-2-Enoate Nanocomposites for Electronic Devices. *Journal of Macromolecular Science, Part B Physics*, 61, 7–8, 958–970. <https://doi.org/10.1080/00222348.2022.2122310>
- Gupta, R. K., Gawad, F. A. E., Ali, E. A. E., Karunanithi, S., Puput Yugiani, P., & Srivastav, P. P. (2024). Nanotechnology: Current applications and future scope in food packaging systems. *Measurement: Food* 13, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.meaf.2023.100131>
- Gur, T., Meydan, I., Seckin, H., Bekmezci, M., & Sen, F. (2022). Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles. *Environmental Research*, 204, 111897. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111897>

- Hamk, M., Akçay, F.A., & Avcı, A. (2023). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Bacillus subtilis* ZBP4 and their antibacterial potential against foodborne pathogens. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53,3, 255–264 <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2076243>
- He, X., Deng, H., & Hwang, H. M. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>
- Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor – tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University – Science*, 30, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.10.002>
- Karakaplan, M. B. (2021). Investigating the Growth Kinetics of Gram-positive and Gram-negative Bacteria in the Presence of Zinc Oxide Nanoparticles and Curcumin. (Publication No. 688550) [Master's thesis, *Izmir Kâtip Çelebi University*].
- Kevenk, T. O., & Aras, Z. (2022). Decontamination Effect of Zinc Oxide Nanoparticles, Rosmarinic Acid and Anatolian Propolis on Foodborne Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(2), 313-318. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i2.313-318.4889>
- Leta, T. B., Adeyemi, J. O., & Fawole, O. A. (2024). Utilizing fruit waste-mediated nanoparticles for sustainable food packaging materials to combat food loss and waste. *Food Bioscience*, 59, 104151. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104151>
- Moradi, M., Tajik, H., Mardani, K., & Ezati, P. (2019). Efficacy of lyophilized cell-free supernatant of *Lactobacillus salivarius* (Ls-BU2) on *Escherichia coli* and shelf life of ground beef. *Veterinary Research Forum*, 10(3), 193–198.
- Nandhini, J., Karthikeyan, E., & Rajeshkumar, S. (2024). "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Eco-Friendly Advancements for Biomedical Marvels". *Resources Chemicals and Materials*. Journal Pre-proof. <https://doi.org/10.1016/j.recmm.2024.05.001>
- Nawaz, A., Farhan, A., Maqbool, F., Ahmad, H., Qayyum, W., Ghazy, E., Rahdar, A., Díez-Pascual, A. M., & Fathi-karkan, S. (2024). Zinc oxide nanoparticles: Pathways to micropollutant adsorption, dye removal, and antibacterial actions - A study of mechanisms, challenges, and future prospects. *Journal of Molecular Structure*, 1312, 138545. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138545>
- Pauzi, N., Zain, N. M., Kutty, R. V., & Ramli, H. (2021). Antibacterial and antibiofilm properties of ZnO nanoparticles synthesis using gum arabic as a potential new generation antibacterial agent. *Materials Today: Proceedings*, 41, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.359>
- Phatak, K. A., Khanna, P. K., & Nath, B. B. (2024). ZnO nanoparticles: A key ingredient of sunscreen shows absence of adverse effects on *Drosophila* melanization pathway. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 38, 101145. <https://doi.org/10.1016/j.nanos.2024.101145>
- Priyadarshi, R., Kim, S. M., & Rhim, J-W. (2021). Carboxymethyl cellulose-based multifunctional film combined with zinc oxide nanoparticles and grape seed extract for the preservation of high-fat meat products. *Sustainable Materials and Technologies*, 29, e00325. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00325>
- Rout, S. S., & Pradhan, K. C. (2024). *Food Control*, 163, 110470. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110470>
- Roy, S., Kim, H. C., Panicker, P. S., Rhim, J. W., & Kim, J. (2021). Cellulose nanofiber-based nanocomposite films reinforced with zinc oxide nanorods and grapefruit seed extract, *Nanomaterials*, 11, 877, <https://doi.org/10.3390/nano11040877>.



Optimization of Sesame Roasting Conditions with Air Fryer and Comparison of Its Properties with Conventional Roasting

Mustafa Şamil Argun^{1,a,*}, Abdullah Kurt^{1,b}

¹Selçuk Üniversitesi, Akşehir Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 42550, Konya, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 18.07.2024 Accepted : 31.07.2024</p> <p>Keywords: Sesame Roasting optimization Air fryer Fatty acid composition HMF</p>	<p>The most important stage in sesame paste (tahini) production is roasting as it affects the physical and chemical properties of sesame. This study aimed to determine the optimum roasting conditions for unhulled sesame seeds used in tahini production using an air fryer and to compare their properties with the conventional method. Within the scope of the study, unhulled sesame seeds were roasted at different temperatures (160°C, 180°C and 200°C) and times (15-70 minutes) by spreading them into the chamber of the air fryer at a rate of 0.8 g/cm³. The temperature and time parameters in the roasting process were optimized using the response surface methodology. According to the ΔE (color difference) and water activity data of the roasted samples, the optimum temperature and time for the air fryer were determined to be 181.1°C and 36.7 minutes. As a result of roasting in an air fryer, the oil yield increased from 50% to 60% compared to conventional roasting. The lowest peroxide value, 1.69 meq O₂/kg, was detected in a hot air fryer at 180°C for 35 minutes. FTIR results also indicated that sesame seeds roasted with an air fryer were more resistant to oxidation. The acidity values and fatty acid compositions of sesame seeds roasted in an air fryer in a time five times shorter were found to be similar to those of conventionally roasted sesame seeds. The HMF content was not observed to form at levels hazardous to health.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2272-2281, 2024

Sıcak hava fritözü ile susam kavurma koşullarının optimizasyonu ve konvansiyonel kavurma ile özelliklerinin karşılaştırılması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 18.07.2024 Kabul : 31.07.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Susam Kavurma optimizasyonu Sıcak hava fritözü Yağ asidi kompozisyonu HMF</p>	<p>Tahin üretiminde en önemli aşama susamın fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilediği için kavurmadır. Bu çalışmada tahin üretiminde kullanılan kabuksuz susam tohumlarının sıcak hava fritözünde optimum kavurma koşullarının belirlenmesi ve özelliklerinin konvansiyonel yöntemle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında kabuğu soyulmuş susam tohumları farklı sıcaklık (160°C, 180°C ve 200°C) ve sürelerde (15-70 dakika) sıcak hava fritözünün haznesine 0,8 gr/cm³ olacak şekilde yayılarak kavurulmuştur. Kavurma işlemindeki sıcaklık ve süre parametreleri yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Kavurulmuş örneklerin ΔE (toplam renk değişimi) ve su aktivitesi verilerine göre sıcak hava fritözünün optimum çalışma sıcaklığı ve süresi 181,1°C ve 36,7 dk olarak belirlenmiştir. Sıcak hava fritözünde kavurma neticesinde konvansiyonel kavurmaya göre yağ verimi %50'den %60'a çıkmıştır. En düşük peroksit değeri 1,69 meq O₂/kg ile 180°C de 35 dk da sıcak hava fritözünde tespit edilmiştir. FTIR sonuçları da sıcak hava fritözü ile kavurulmuş susamların oksidasyona karşı daha dayanıklı olduğunu desteklemiştir. Sıcak hava fritözü ile 5 kat daha kısa sürede kavruan susamların konvansiyonel kavurmaya göre asitlik değerleri ve yağ asidi kompozisyonları benzer bulunmuştur. HMF içeriğinde ise sağlık açısından riskli seviyede bir oluşum gözlenmemiştir.</p>

^a msargun@selcuk.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0001-8209-3164>

^a abdullah.kurt@selcuk.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0003-1452-3278>



Giriş

Susam bitkisi (*Sesamum indicum* L.), tohumları %45-60 yağ içeriği ile dünyada kültüre alınarak yetiştirilen ilk yağlı tohum bitkisidir (Kaplan, 2022; Şahin, 2014). Susam, bitkisel protein ve doymamış yağ asitlerince zengin olup, vitamin, mineral ve lif açısından değerli bir kaynaktır. Susam küresel ölçekte çoğunlukla Afrika ve Asya'da yetiştirilmektedir. Dünyadaki toplam susam üretiminin yaklaşık %95,9'u bu kıtalarda üretilmektedir. Dünya susam üretiminde ilk üç sırada Sudan, Myanmar, Tanzanya yer almaktadır (Lukurugu ve ark., 2023; Rahman ve ark., 2020; Zebib ve ark., 2015). Kabuğu soyulmuş ve kavrulmuş susamın öğütülmesi ile başka herhangi bir bileşen eklenmeden veya çıkarılmadan tahin elde edilir (Abu-Jdayil ve ark., 2002). Kavurma, fiziksel ve kimyasal özellikleri etkilediği için tahin üretiminde en önemli aşamadır. Susam tohumları genellikle 130-210°C aralığında taşınım, iletim veya radyasyon ısı transfer mekanizmaları ile kavrulur (Jin ve ark., 2022; Kahyaoglu ve Kaya, 2006). Yüksek miktardaki lipit (ağırlıkça %60) ve çoklu doymamış esansiyel yağ asidi, protein (ağırlıkça %25), karbonhidrat (ağırlıkça %6,4-9) yanında niasin, tiamin gibi vitaminler, kalsiyum, fosfor, çinko, selenyum ve demir gibi bazı mineraller içermesi nedeniyle tahinin besin değeri yüksektir (Abu-Jdayil ve ark., 2002; Gharby ve ark., 2017; Pellet ve Shadarevian, 1970; Sawaya ve ark., 1985). Tahin üretiminde kullanılacak susamın kavrulması esnasında 180°C gibi yüksek sıcaklıklara çıkıldığından Maillard reaksiyon ürünleri oluşmaktadır. Ayrıca kavrulmuş susam tohumlarının uçucu yağ asidi profilinde ham susama kıyasla duyuşsal özellikleri zenginleştiren önemli değişiklikler olmaktadır (Abib ve ark., 2023). Kavurma işlemi susam tohumlarının doku, sertlik ve renk gibi fiziksel özelliklerini etkiler ve tohumlar daha kırılğan, hassas ve gevrek hale gelir (Kahyaoglu ve Kaya, 2006). Kavurma, susam tohumlarının a^* değerini, antioksidan aktivitesini, p -anisidin ve peroksit değerlerini değişken oranlarda artırırken, L^* değerlerini, su miktarını ve linolenik asit içeriğini azaltmaktadır (Mohamed Ahmed ve ark., 2021). Ayrıca kavurma işlemi ile sıcaklığa bağlı olarak 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve akrilamid oluşumu gözlenebilmektedir (Berk ve ark., 2020). Kavurma işlemlerinde, akrilamid miktarı zamanla artmakta ve sıcaklığın akrilamid oluşumu üzerinde zamana göre çok daha güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Amrein ve ark., 2005). Akrilamid, 2A grubunda kanserojen olarak sınıflandırılmıştır ve sağlık açısından riskleri bulunabilmektedir (Sarion ve ark., 2021). HMF'nin antikarsinogenik, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-alerjen gibi olumlu etkilerinin yanında öngörülen sınırın ötesinde tüketilmesi insanlar için sitotoksiktir ve üst solunum yolu, göz, cilt vb. mukoza zarlarını tahriş edebilmektedir (Choudhary ve ark., 2021; Pastoriza de la Cueva ve ark., 2017). Ayrıca furan, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve akrilamid gibi toksinlerin oluşumundan da HMF sorumlu olabilmektedir (Anese ve Suman, 2013).

Geleneksel kavurma yöntemlerinin dezavantajlarını azaltmak için önerilen alternatif bir yöntem sıcak hava fritözüdür (air fryer). Bu sistem, esas olarak malzemenin etrafındaki sıcak havayı kullanarak çeşitli kızartılmış ürünler üretmeyi amaçlayan havada kızartma işlemidir. Bu teknik, sıcak havadaki yağ damlacıklarından oluşan ince

bir sis ile cihazın haznesi içindeki ürün arasında doğrudan temas yoluyla etki eder. Isı transferi son derece yüksektir ve ürün içerisinde eşit şekilde dağıtılır, bu da kalitedeki farklılıkları en aza indirir (Shaker, 2014; Teruel ve ark., 2015; Zaghi ve ark., 2019).

Tahin üreten firmalar susam kavurma işlemini çift cidarlı ekipmanlar içerisinde kızgın buhar veya yağ kullanarak 3 saat gibi uzun bir sürede yapmaktadırlar. Bu çalışmada söz konusu konvansiyonel yöntem alternatif olarak kavurma işlemi, sistemin direk kendi ürettiği sıcak hava ile ısı transfer katsayısı daha yüksek şartlarda çalışan sıcak hava fritözü aracılığıyla gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle tahin işleme sektöründe kullanımı daha kolay bir yöntem olabilmesi için sıcaklık-süre koşullarının iyileştirildiği şartlarda susam kavurma potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Araştırmada kullanılan susam, Etiyopya menşeli olup Konya ili Akşehir ilçesinde faaliyet gösteren Ak-Hel Helva Tahin firmasından temin edilmiştir. Susam taneleri işletmede, suda bekletme, kabuk soyma, yıkama ve santrifüj ön işlemlerinden geçirilerek kavurma aşamasına hazır hale getirilmiştir. Tahin üretimi için gerekli ön işlemleri tamamlanmış ve kavurma aşamasına ulaşmış susam numunesi örnek olarak alınarak laboratuvarında işleme alınmıştır.

Yöntem

Sıcak hava fritözü ile kavurma işlemi

Kavurma işleminde, sıcaklık ve zaman kontrollü sıcak hava fritözü kullanılmıştır (Philips HD9252/90 Essential Airfryer). Her bir sıcaklık süre normu için 200 gr susam örneği sıcak hava sirkülasyonuna uygun 250 cm³ hacmindeki teflon elek içerisinde kavrulmuştur. Kavurma işlemi 3 farklı sıcaklık ve süre olmak üzere toplam 9 farklı noktada yapılmıştır (200°C'de 15-20-25 dk, 180°C'de 25-30-35 dk, 160°C'de 50-60-70 dk). Ayrıca kontrol örnek olarak, fabrikada konvansiyonel yöntemle kavruşan (180°C'de 3 saat) susam numunesine çalışmada yer verilmiştir. Fabrikada susamın kavurma işlemi odun ateşi veya doğalgaz ile ısıtılmış kızgın yağın veya buharın etrafından geçirildiği, cidarlı susam kavurma kornigi içerisinde gerçekleştirilmektedir. Kavrulmamış susam ile toplam 11 örneğin renk ve su aktivitesi analizleri yapılmıştır (Çizelge 1). Kontrol örneğinin, ΔE değerine (kavrulmamış susama göre hesaplanan) en yakın ve su aktivitesi değerinin en düşük olduğu koşullar için yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon yapılmıştır. Optimum koşullarda kavruşan susam, konvansiyonel yöntem ile kavruşan susam ve kavrulmamış susam örneklerinin kimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırması yapılmıştır.

Renk Analizi

Susam örneklerinin renk ölçümleri CR400 kolorimetre (Minolta, Osaka, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Renk parametreleri olan L^* (açıklık-koyuluk, 100:beyaz, 0:siyah), a^* (+:kırmızı (+100), -:yeşil (-80), 0:gri) ve b^* (+:sarı (+70), -:mavi (-80), 0:gri) değerleri 4 farklı noktadan ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Ayrıca

kavrulmamış susam örneğine kıyasla toplam renk değişimi (ΔE) aşağıda verilen denklige göre hesaplanmıştır:

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

Su aktivitesi (a_w) analizi

Susam örneklerinin su aktivitesi (a_w) değerleri, su aktivitesi ölçüm cihazıyla (Aqualab 4TE, Münih, Almanya) 20°C'de belirlenmiştir.

Ham yağ

Susam örneklerinde ham yağ tayini için susam numunesi 5-10 gr aralığında tartılarak (M, gr), susuz Na₂SO₄ ile ekstraksiyon kartuşu içerisinde karıştırılmıştır. Soxhlet yağ ekstraksiyonu sisteminde, hegzan ile çözücü ekstraksiyonu sonrasında, kartuş içeriği tekrar öğütülerek ekstraksiyon tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda, darası bilinen balon içerisindeki çözücü, ısıl işlemle uzaklaştırılarak etüvde sabit ağırlığa getirilerek son tartım alınmıştır. Ham yağ oranı yüzde olarak aşağıda verilen denklige göre hesaplanmıştır:

$$\frac{\text{Son Tartım} - \text{Dara}}{M(\text{gr})} \times 100$$

Serbest yağ asitliği

Susam örneklerinin serbest yağ asidi içeriği TS EN ISO 660 yöntemine göre belirlenmiştir. 10 gr ekstrakt 100 ml çözücü (%95 etanol: dietileter v/v) ile karıştırılmıştır. Karışıma 1 ml fenolftalein eklenerek 0.5 N KOH ile titrasyon yapılmıştır. Oleik asit cinsinden hesaplama aşağıda verilen denklige göre yapılmıştır.

$$\frac{\text{Harcanan ml KOH} \times 0,5N \times 282}{M(\text{gr}) \times 10}$$

Peroksit Tayini

Susam örneklerinin peroksit sayısı TS EN ISO 3960 yöntemine göre belirlenmiştir. 10 gr ekstrakt içerisine 10 ml kloroform ve 15 ml asetik asit ilave edilip karıştırılmıştır. 0,5 ml %30'luk KI eklenerek 3 dk karanlıkta bekletilmiştir. 1 mL nişasta çözeltisi eklenerek 0.1 N sodyum tiyosülfat ile titrasyon yapılmıştır. Peroksit içeriği meq O₂/kg olarak aşağıda verilen denklige göre hesaplanmıştır (Neme ve ark., 2023).

$$\frac{(\text{Sarfiyat} - \text{Kör}) \times 0,1 \times 1000}{M(\text{gr})}$$

Yağ asidi kompozisyonu

Susam örneklerinin yağ asidi bileşimleri Arslan ve ark. (2017)'nin yöntemine göre GC MS-FID kullanılarak belirlenmiştir. Analiz, bir FID dedektörü, GC kolonu (RT-2560 100 m × 0,25 mm × 0,25 µm), giriş sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 280°C ve otomatik örnekleyici ile donatılmış Shimadzu GCMS-QP2020 sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar toplam yağ asitlerinin ağırlık/ağırlık (%) olarak ifade edilmiştir.

HMF

HMF standart yöntemle belirlenmiştir (AOAC 980.23). Yaklaşık 10 gr örnek homojen hale getirilerek su ile karıştırılarak 0,45 µm'lik membran filtreden süzümüştür. UV dedektör, degasser ve gradient pompa, sıcaklık

kontrollü fırın ve bir otomatik örnekleyici ile birleştirilmiş Waters Alliance sistemi ile HMF içeriği ppm (milyonda bir) olarak analiz edilmiştir. Kromotografik ayırım RP-18 3 µm 4,6 × 150 mm kolon ile yapılmıştır. Tespit dalga boyu 285 nm'ye ayarlanmıştır.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Susam örneklerinin FTIR spektrumları ATR-FTIR (Bruker Alpha II, Ettlingen, Germany) cihazı ile belirlenmiştir. Ölçümün yapılacağı dalga boyu aralığı 4000-650 cm⁻¹'dir. Spektrum datalarının düzeltilmesi (Data Tune-up) cihaza ait yazılım ile yapılmıştır.

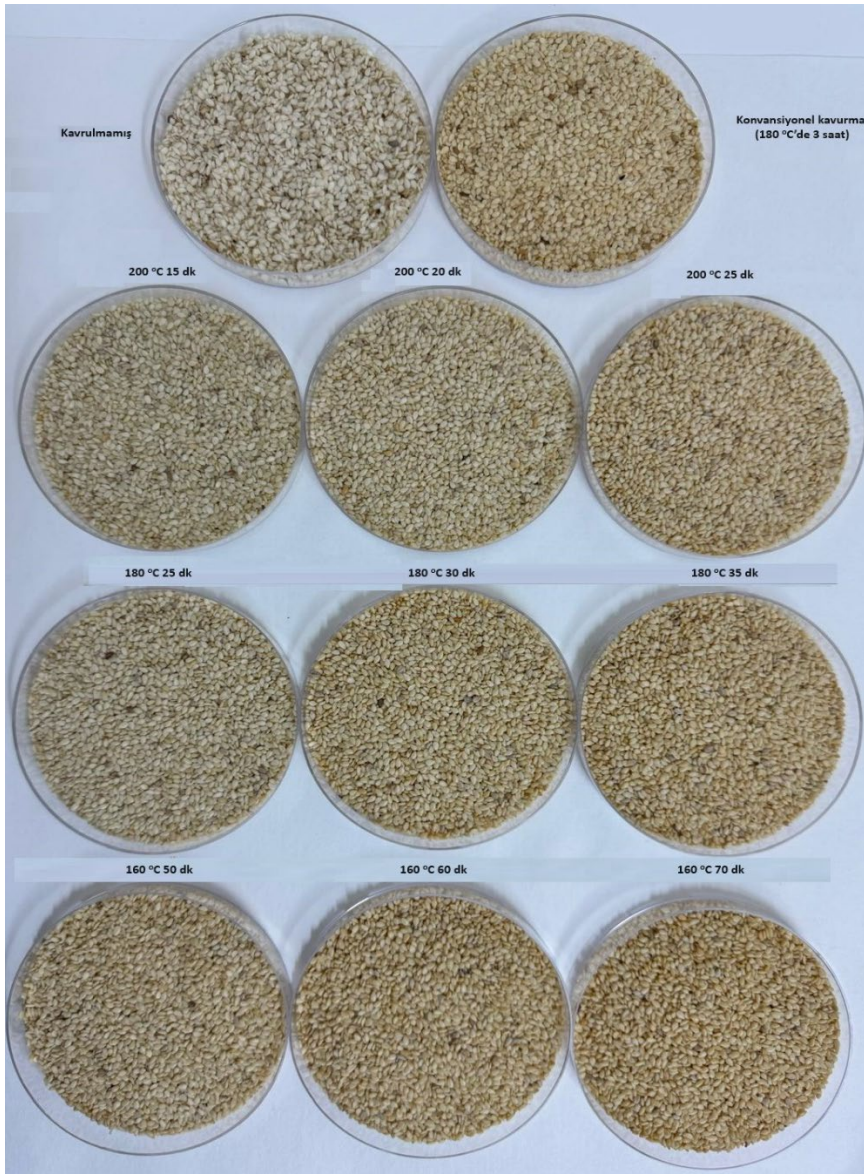
İstatistiksel Analizler

Optimizasyon ve istatistiksel analizler için Statgraphics-19 (STCC, Inc. ABD) programı kullanılmıştır. Yapılan ön deneme sonuçlarına göre kullanıcı tanımlaması kapsamında belirlenen 3 farklı sıcaklık ve 3 farklı süre koşullarında optimizasyon için susamlar kavurulmuştur. Optimizasyonda renk için konvansiyonel ürün değerleri hedef seçilirken su aktivitesi değeri de minimize edilmiştir. Analizler her örnek için iki tekrar olarak yapılarak aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları (±) hesaplanmıştır. Ortalamalar, varyans analizi (ANOVA) yoluyla %5 anlamlılık düzeyinde Duncan testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Görsel özellikler

Farklı sıcaklık ve süre koşullarında kavruan susamların görsel özellikleri Şekil 1'de sunulmuştur. Görsel özellikler tüketici tercihini etkileyen bir parametredir. Tahin üretiminde ise kavurma işlemi, susamın mekanik işleme tahine dönüşüm prosesine ne derece hazır olduğunu belirlemede ve tahinde arzu edilen aromatik karakterin oluşmasında önemlidir. Bu kalite parametrelerinin belirlenmesinde kavurma aşamasında ortaya çıkan esmerleşme ve karamelizasyon reaksiyonlarına bağlı olarak kahverengi pigmentlerin artışı belirleyici rol oynamaktadır (Saklar ve ark., 2001). Koyulaşma ile birlikte susam tanelerinin parlaklaşması da beklenen bir görsel gelişimdir (Kahyaoglu ve Kaya, 2006). Görsel özelliklerdeki bu değişimler susam yapısından uzaklaştırılan nem ile su aktivitesindeki düşüş ile de ilişkilendirilmektedir. Şekil 1'de görüldüğü gibi kavurma işleminde artan sıcaklık ve süre ile, kavrulmamış nemli susamların renklerinin koyulaştığı ve topaklaşmış haldeki susam tanelerinin ayrılarak işlenebilir forma ulaştığı belirlenmiştir. Sıcak hava fritözü ile kavruan susam tanelerinin görsel özelliklerinin, konvansiyonel kavurma ile benzer özellikte olabileceği görülmüştür. 160°C'de 60 dk sonrasında, 180°C'de 30 dk sonrasında ve 200°C'de ise 25 dk sonrasında konvansiyonel kavurmaya benzer görsel özelliklere ulaşılmıştır. Bir çalışmada, sıcak hava fırınında artan kavurma sıcaklığı (120-180°C) ve süresinin (10-30 dk) bir fonksiyonu olarak susam tohumlarının görsel renginin, soluk, açık sarı, sarı, açık kahverengi ve koyu kahverengi şeklinde değişim trendi sergilediği belirlenmiş ve bu değişimlerin Maillard ve karamelizasyon reaksiyonları ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (He ve ark., 2023).



Şekil 1. Farklı kavurma sıcaklıklarında susam tanelerinin görüntüleri
Figure 1. Images of sesame seeds at different roasting temperatures

Sıcak Hava Fritözü ile Yapılan Kavurma İşleminin Optimizasyonu

Örneklerin Renk ve Su Aktivitesi Değerleri

Yanıt yüzey yönteminde (Response Surface Methodology) çalışılan parametrelere ait renk ve su aktivitesi değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Değerler incelendiğinde kavurma işlemi ile susam tohumlarının kavrulmamış örneklere göre L^* değerinin azaldığı, a^* ve b^* değerlerinin ise arttığı görülmektedir. Özalp (2019) farklı sürelerde susamın kabuklu olarak kavrulması üzerine yaptığı çalışmasında kavurma işleminin susam yağının L^* değerini azalttığını, a^* ve b^* değerlerini ise artırdığını tespit etmiştir. Konvansiyonel yöntemle kavru lan ürünün kavrulmamış ürüne göre renk farklılığını gösteren ΔE değeri 11,51 olarak hesaplanmıştır. Bu değere en yakın ΔE değeri 160°C'de 60 dk sıcak hava fritözü ile kavru lan susamdan elde edilmiştir. Durmuş ve Mercan (2019) hava sirkülasyonlu fırında 1-60 dk arası farklı kavru lma sürelerinde susamların ΔE değerlerinin en fazla 60 dakikada olmak üzere 2-15 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Mikrodalga yöntemi ile yapılan kavurma

işlemlerinde ise a^* değeri daha fazla artmakta ve ΔE değerleri 40-50 gibi yüksek değerler çıkabilmektedir (Isam A Mohamed Ahmed ve ark., 2020).

Kavru lan susamların su aktivitesi değerleri 0,09 ile 0,40 arasında değişmiştir. Optimizasyonda su aktivite değeri minimize edilmiştir. Durmuş ve Mercan (2019) farklı kavurma yöntemleri uyguladıkları susamların su aktivitesi değerlerinin 0,1-0,2 civarında olduğunu bildirmişlerdir.

Optimizasyon

Sıcak hava fritözü ile yapılan kavurma işlemine ait yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yapılan optimizasyon sonuçları Şekil 2 ve Çizelge 2'de sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde 'desirability' değeri en yüksek çalışma koşullarının 160°C'de 60 dk ve 180°C'de 35 dk olduğu görülmektedir. Değerler hedef ΔE ve minimum su aktivitesi açısından optimize edildiğinde optimum sıcaklık ve süre 181,1°C ve 36,7 dk olarak bulunmuştur. İleriki analizlerde optimum bulunan 160°C'de 60 dk ve 180°C'de 35 dk kavurma işlemlerinden elde edilen susam numuneleri kullanılmıştır.

Çizelge 1. Optimizasyon çalışmasında kullanılan parametrelere ait renk ve su aktivitesi değerleri

Table 1. Color and water activity values of the parameters studied in the optimization study

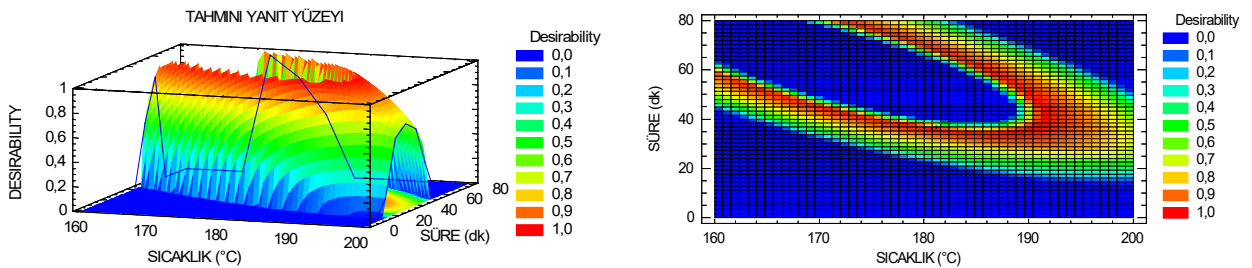
Örnek	L*	a*	b*	ΔE	Su Aktivitesi
Kavrulmamış	76,25±0,74	0,31±0,13	19,06±0,24	-	0,99±0,01
KK	69,79±1,74	2,73±0,41	28,26±1,20	11,51	0,14±0,02
Sıcak Hava Fritözü ile Kavurma					
160°C 50 dk	73,17±0,37	2,18±0,24	26,30±1,18	8,10	0,10±0,01
160°C 60 dk	68,23±1,84	3,12±0,22	27,12±0,60	11,72	0,12±0,02
160°C 70 dk	68,37±1,07	3,41±0,54	28,79±0,65	12,90	0,11±0,02
180°C 25 dk	70,38±1,23	1,06±0,32	21,88±1,24	6,55	0,13±0,01
180°C 30 dk	69,08±1,46	2,51±0,29	26,06±1,06	10,26	0,13±0,01
180°C 35 dk	70,49±1,23	2,54±0,45	27,03±1,10	10,08	0,09±0,01
200°C 15 dk	70,94±3,51	0,75±0,39	22,78±0,92	6,50	0,40±0,02
200°C 20 dk	73,16±2,42	1,59±0,37	24,88±0,87	6,71	0,14±0,01
200°C 25 dk	72,22±0,90	2,52±0,35	26,45±0,78	8,71	0,11±0,01

KK: Konvansiyonel Kavurma (180°C 3 saat)

Çizelge 2. Sıcak hava fritözü ile kavurmada sıcaklık ve sürenin ΔE ve su aktivitesi değerleri açısından optimizasyonuna ait değerler

Table 2. Optimization values of temperature and time in air fryer roasting in terms of ΔE and water activity values

	Desirability	Desirability	Ağırlıklar	Ağırlıklar	
Yanıt	En düşük	En yüksek	Hedef	Birinci	İkinci
ΔE	6,0	12,0	11,508	1,0	1,0
Su aktivitesi	0,0937	0,4005	Minimize	1,0	
Desirability Değerleri					
Koşullar	ΔE	Su aktivitesi	Tahmin Edilen Desirability	Gözlemlenen Desirability	
160°C 50 dk	8,096	0,099	0,641	0,611	
160°C 60 dk	11,718	0,119	0,934	0,725	
160°C 70 dk	12,904	0,105	0,0	0,0	
180°C 25 dk	6,553	0,129	0,379	0,298	
180°C 30 dk	10,264	0,125	0,716	0,833	
180°C 35 dk	10,081	0,094	0,937	0,861	
200°C 15 dk	6,502	0,400	0,081	0,0	
200°C 20 dk	6,714	0,138	0,393	0,333	
200°C 25 dk	8,705	0,105	0,639	0,687	
Optimizasyon					
Faktör	En Düşük	En Yüksek	Optimum		
Sıcaklık (°C)	160,0	200,0	181,144		
Süre (dk)	15,0	70,0	36,6894		



Şekil 2. Sıcak hava fritözü ile kavurmada sıcaklık ve sürenin susamın ΔE ve su aktivitesi değerleri açısından optimizasyonu

Figure 2. Optimization of temperature and time in air fryer roasting in terms of ΔE and water activity values of sesame

Sıcak Hava Fritözü ile Yapılan Kavurma İşleminin Susamın Bazı Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri

Kavurmanın amacı, yağlı tohumların mikro yapısını, fiziksel durumunu veya kimyasal bileşimini sıcaklık ve nem yoluyla değiştirmek, dolayısıyla yağlı tohumların hücre hasarını, yağ birikimini ve enzimatik inaktivasyonunu teşvik etmektir. Bu uygulama, sıkma işleminde yağ verimini artırmaktadır. Aynı zamanda, indirgeyici şekerlerin serbest amino asitlerle Maillard

reaksiyonu, susam yağının lezzetini zenginleştirmekle kalmaz, aynı zamanda yüksek sıcaklıkta kavurma sırasında antioksidan aktiviteyi de geliştirir. Ancak uygunsuz veya aşırı yüksek kavurma sıcaklıkları susam proteinine ciddi zarar verecek ve susam kekinin uygulama değerini azaltacaktır (Bi, 2005; Ji ve ark., 2019). Çalışmamızdaki kavurma işleminin susam tohumlarının ham yağ, serbest yağ asitliği, peroksit ve HMF değerleri üzerine etkileri Çizelge 3'de sunulmuştur.

Çizelge 3. Kavrurma işleminin susam tohumlarının bazı kimyasal özellikleri üzerine etkisi

Table 3. Effect of roasting on some chemical properties of sesame seeds

Örnek	Ham Yağ (%)	Asitlik (oleik asit cinsinden)	Peroksit (meq O ₂ /kg)	HMF (ppm)
Kavrulmamış	30,4±7,2 ^a	2,03±0,24 ^b	11,25±0,82 ^c	0,36±0,03 ^a
Konvansiyonel Kavrurma (180°C 3 saat)	50,4±2,0 ^b	0,38±0,05 ^a	5,98±0,10 ^b	0,67±0,02 ^a
Sıcak Hava Fritözü 160°C 60 dk	60,8±1,0 ^c	0,28±0,01 ^a	10,96±0,41 ^c	3,80±0,01 ^c
Sıcak Hava Fritözü 180°C 35 dk	60,7±0,5 ^c	0,27±0,02 ^a	1,69±0,04 ^a	2,79±0,23 ^b

Ortalama ± Standart Sapma (n = 2). Aynı sütunda yer alan harfler (a-c) değerler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.

Ham Yağ Miktarının Belirlenmesi

Susam örneklerinin ham yağ verimleri sıcak hava fritözü ile kavrurma (%60)>konvansiyonel kavrurma (%50)>kavrulmamış (%30) şeklinde bulunmuştur (Çizelge 3). Sıcak hava fritözü ile kavrurma önemli ölçüde ham yağ verimini artırmıştır (p<0,05). Kavrulmamış kabuksuz susam örneklerinin ham yağ verimlerinin düşük çıkması, ıslak halde ve %34 su içeriğine sahip olmaları ile ham yağ verimini artıran hücre hasarı meydana gelmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kaplan (2022) kabuksuz kavurulmuş susamlarda ham yağ değerlerini %58-66 arasında bulurken ön kurutma çıkışı kavurulmamış susamlarda (yaklaşık %30 su içeren) bu değer düşmüş ve %40 civarında bulunmuştur. Özcan ve Akgül (1995), farklı lokasyonlardan sağladıkları 16 susam örneğinde ham yağ içeriklerinin %52,0-57,21 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Asghar ve ark. (2014) %5,6 nem içeriğine sahip susamların %48,6 ham yağ içerdiğini bildirmiştir. Akpınar (2017) ise, susam çeşitlerinin ham yağ içeriklerinin %31,4-47,1 arasında değişebileceğini belirtmiştir. Değerler çalışmamızdaki değerler ile benzerlik göstermektedir. Şimşek (2009), mikrodalga ve etüv ile kavrurmada sıcaklık uygulamasının susam tohumlarının ham yağ verimini etkilediğini ve azalttığını bildirmiştir. Çalışmamızda sıcak hava fritözünün mikrodalga ve etüv uygulamasına göre ham yağ verimi açısından daha olumlu etkileri olduğu anlaşılmıştır. Ji ve ark. (2019), sağlığa yararlı bileşimiyle birlikte olumlu duysal niteliklere sahip susam yağının susamın 160°C ile 180°C arasında ve 20-30 dakikayı aşmayacak şekilde kavurulmasıyla elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

Serbest Yağ Asitlik Değeri

Susam örneklerinin asitlik değerleri (oleik asit cinsinden) kavrulmamış>konvansiyonel=sıcak hava fritözü şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 3). Kavrurma işlemi asitlik değerini azaltmıştır (p<0,05). Özcan (1993) yerli ve ithal susamların serbest yağ asidi değerlerini %1-2 arasında tespit etmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Kavrurma işlemi ile asitlik değerlerinin azalması; yağın termal bozunması ve oksidasyonunun alkanlar, aldehitler, alkoller, esterler ve karboksilik asitler gibi çeşitli uçucu bileşikler üretmesinden (Ji ve ark., 2019), yağ asitlerinin Maillard reaksiyonuna katılmasından (Mottram, 1998) ve küçük molekül ağırlığına sahip asitlerin uçmasından (Ji ve ark., 2019) kaynaklanıyor olabilir.

Peroksit Değerleri

Peroksit değeri, depolama sırasında yağın oksidasyonunun izlenmesi açısından önemli bir endekstir ve kritik değeri aştığında gıda zehirlenmesine neden olabilir (Gotoh ve Wada, 2006; Zhang ve ark., 2021). Yemeklik yağlar için peroksit değerinin üst sınırı 10 meq

O₂/kg'dır (Alimentarius, 1992; FAO, 1994). Çalışmamızda kavrulmamış susam ile 160°C 60 dk sıcak hava fritözü ile kavurulmuş susamın değerleri sınırdan yüksek çıkmıştır (Çizelge 3). Sıcak ve nemli koşullar yağ peroksidasyonunu artırmaktadır (Mohammed ve ark., 2018). Hammaddemiz Etiyopya'dan ithal edilmiştir. Etiyopya'nın nemli bölgeleri bulunmaktadır (Gonfa, 1996). Dolayısıyla kavrulmamış susamın peroksit değerinin yüksek çıkması, yetiştiği bölgede veya taşıma, depolama ve işleme sırasında yüksek sıcaklık ve neme maruz kalma ihtimalini düşündürmektedir.

Konvansiyonel kavrurma ve 180°C 35 dk sıcak hava fritözü ile kavrurmada peroksit değerleri önemli miktarda azalmıştır (p<0,05). Peroksit değeri kavrulmamış susamlarda genotip ve yetiştirme şartlarına göre 1-5 meq O₂/kg aralığında değişebilmektedir. Peroksitler kararlı bileşikler değildir ve uygulanan sıcaklığın etkisiyle artış veya azalış gösterebilirler (Isam A Mohamed Ahmed ve ark., 2020). Konvansiyonel ve mikrodalga ile kavrurmada susamın peroksit değerlerinde artışlar gözlemlenebilirken (Isam A Mohamed Ahmed ve ark., 2020; Mohamed Ahmed ve ark., 2021) sıcak hava fritözü ile yaptığımız kavrurmada azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, birincil oksidasyon ürünlerinin ikincil oksidasyon ürünlerine dönüşmesi kaynaklı olabilir.

HMF Değerleri

5-Hidroksimetil-2-furfural (HMF), alkol ve aldehit fonksiyonel grupları içeren altı karbonlu bir heterosiklik aldehittir. Nemli koşullar altında HMF hidrolize uğrar. Kavrurma işlemlerinin erken aşamalarında yoğun HMF oluşumu gözlemlenirken ilerleyen aşamalarda HMF miktarları azalmaktadır. Artan sıcaklık ve süre HMF'nin bozunmasına neden olmaktadır (Choudhary ve ark., 2021; Kowalski ve ark., 2013). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre çiçek balında en fazla 40 mg/kg HMF bulunmasına izin verilmektedir (Çaçan ve ark., 2023). Çalışmamızda susam örneklerinin HMF değerleri 0,36 ile 3,80 mg/kg arasında değişmiştir (Çizelge 3). Konvansiyonel yöntemle 3 saat süren kavrurmada HMF değeri kavrulmamış örneğe benzer (p>0,05) çıkmıştır. Konvansiyonel yöntemle göre oldukça kısa süren sıcak hava fritözündeki kavrurma işleminde ise mevzuat sınırlarının altında kalmakla beraber HMF değerlerinde artış gözlenmiştir (p<0,05). Berk ve ark. (2020), 180, 200 ve 220°C'de 10-30 dakika arasında değişen konvansiyonel yöntemle kavrurma süreleri sonunda susam tohumlarında HMF konsantrasyonlarının arttığını ve sırasıyla 75,6 ± 8,5, 60,5 ± 3,4 ve 39,8 ± 1,1 mg/kg olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca HMF'nin, yüksek sakkarozlu ancak sınırlı indirgen şeker içeren belirli gıda sistemlerinde (susam kavurulmasında olduğu gibi) akrilamid oluşumunda önemli bir rol oynayan kritik bir ara madde olduğunu belirtmişlerdir. HMF'nin karbonil

grubu, kuru ısıtma koşulları altında asparajini akrilamide dönüştürebilmektedir (Gökmen ve ark., 2012). Dolayısıyla yüksek sıcaklıkta ve uzun süreli kavurma işlemlerinde HMF'nin bozunması ve/veya başka bileşiklere dönüşmesi (furan, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve akrilamid gibi) nedeniyle 3 saat süren konvansiyonel kavurma işlemine ait susamda HMF miktarı kontrol ile benzer çıkmış olabilir.

Yağ asidi kompozisyonu

Sıcak hava fritözü ve konvansiyonel yöntemle kavrulmuş susam örnekleri ile kavrulmamış susamın yağ asidi profili Çizelge 4'de sunulmuştur. Kavurma işleminin genel olarak ham susamın yağ asidi içeriğini indirmediği ve en fazla düşüşün toplam doymuş yağ asidi içeriğinde olduğu görülmüştür. Literatürde mikrodalga ile kavurma işleminin uygulandığı farklı ülkelere ait susam içeriklerinde yağ asidi değişimi çeşitlilik göstermektedir. Türkiye kaynaklı susamlarda önemli bir değişiklik olmazken, Sudan, Hindistan ve Nijerya kaynaklı susamların yağ asidi içeriklerinde düşüşler görülmüştür (Isam A. Mohamed Ahmed ve ark., 2020). Çalışmalarda gözlenen farklılıklar susam tohumlarının genotipi ve kavurma koşullarındaki farklılıklara ve kavurma prosesinin ısı aktarımı sırasındaki mekanizmalara bağlanabilir. Bu çalışmadaki yağ asidi içeriği kompozisyonu ve oranları literatür sonuçları ile örtüşmektedir (Isam A. Mohamed Ahmed ve ark., 2020; Tenyang ve ark., 2017). Kavurma yöntemlerinin susamdaki palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), linolenik asit (C18:2), araşidik asit (C20:0), cis-11-eikosenoik asit (C20:1), behenik asit (C22:0) ve lignoserik asit (C24:0) içeriğine istatistiksel açıdan bir etkisi olmamıştır ($p>0,05$). Sıcak hava fritözü ile kavurulmuş susamlar, konvansiyonel kavurmaya göre daha yüksek oranda linoleik asit içerirken ($p<0,05$), en yüksek palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:1) ve linoleik asit içeriği (C18:2) 160°C'de 60 dk sıcak hava fritözünde görülmüştür. Kavrulmamış susamda tekli doymamış yağ asitleri daha fazla iken, kavurulmuş susamlarda çoklu doymamış yağ asidi içeriği yüksek bulunmuştur. Kavurulmuş susamlar oleik-linoleik asit grubu olarak kategorize edilmektedir (Tenyang ve ark., 2017). Bu yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalıkları önleyici etkiye

sahip olduğu, özellikle linoleik asidin serum kolesterol ve LDL seviyesini düşürdüğü, oleik asidin ise HDL'yi arttırıcı bir role sahip olduğu belirtilmiştir (FAO, 1994; Tenyang ve ark., 2017). Çoklu doymamış yağ asidi oranı en yüksek kavurulmuş susam 160°C'de 60 dk koşullarındaki olup, 180°C'de 35 dk sıcak hava fritözü ile kavurma konvansiyonel kavurma ile benzerdir. Sonuç olarak konvansiyonel yöntemle kıyasla, daha düşük sürede kavurma işleminin gerçekleştiği sıcak hava fritözü uygulamasının, tahin üretiminde kullanılacak susamın yağ asidi içeriğinde genel olarak önemli bir değişikliğe neden olmadığı ve yağ asidi içeriği kaynaklı aroma oluşumunda önemli bir farklılığın ortaya çıkmayacağı söylenebilir.

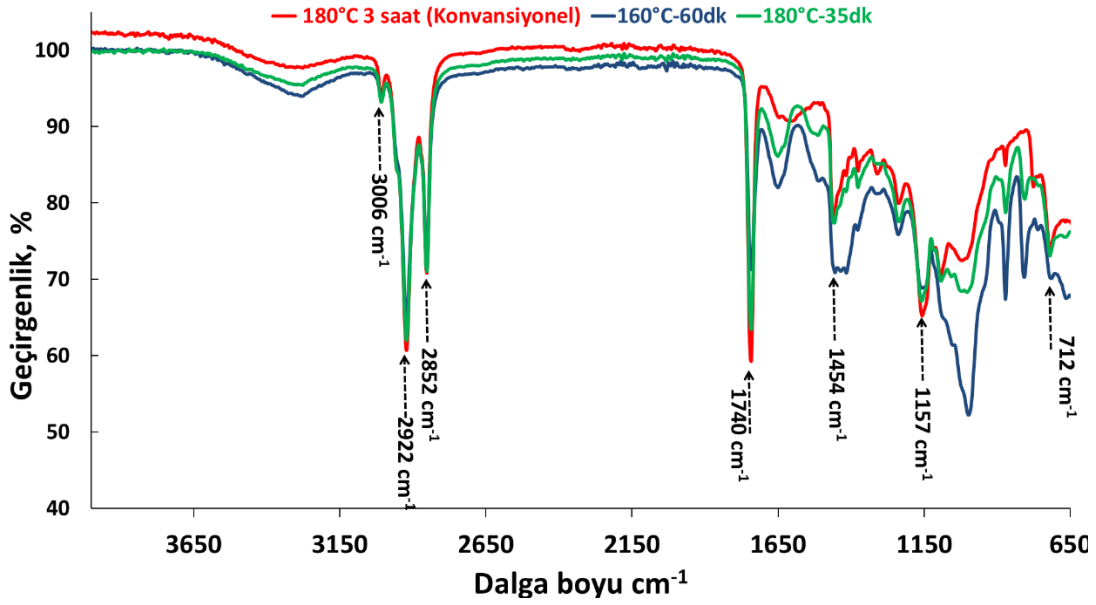
FTIR

Seçilen kavurma yöntemlerinden elde edilen susam tohumlarının FTIR spektrumları Şekil 3'te sunulmuştur. Tüm kavurma yöntemleri için pik şiddetlerinde farklı seviyeler olmasına rağmen genel olarak benzer bant konumları ortaya çıkmıştır, bu sonuç yöntemler arasında benzer bileşenlere işaret etmektedir. 3006 cm^{-1} 'deki pikin şiddeti sıcak hava fritözü ile kavruan susamlarda daha yüksek bulunmuştur, bu pik doymamış yağ asitleri ile ilişkilendirilmektedir (Sundar ve ark., 2022) ve bu çalışmadaki doymamış yağ asidi kompozisyonu sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. 2922 ve 2852 cm^{-1} dalga boyundaki pikler sırasıyla CH_2 'nin sırasıyla simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerini göstermekte olup oksidasyonun izlenmesine yardımcı olan ve örneklerin ileri oksidasyon durumuyla ilgili bilgi veren piklerdir (El-Beltagi ve ark., 2022). Bu nedenle yüksek pik şiddeti ile 180°C'de 3 saat kavurma yönteminin oksidasyona daha duyarlı susam ürünlerinin oluşturduğu ve sıcak hava fritözü ile kavurmanın ise indirgeyici rol aldığı söylenebilir. Doymuş aldehit ve karbonil bileşik fonksiyonel grupları ile ilişkilendirilen 1740 cm^{-1} 'de görülen titreşim $\text{C}=\text{O}$ gerilmelerini göstermektedir (Ng ve ark., 2014). 1454 cm^{-1} 'deki pik CH_2 ve CH_3 eğilme titreşimlerine ve 1157 cm^{-1} ise $\text{C}-\text{O}$ gerilme titreşimlerine atfedilmektedir (Vlachos ve ark., 2006). 1157 cm^{-1} ve 1738 cm^{-1} dalga boylarındaki keskin pikler, peroksitlerin ikincil oksidatif ürünlere ayrışması ve yağların peroksit sayısındaki değişikliklerle ilişkilendirilmektedir (Kaur ve ark., 2021).

Çizelge 4. Kavurma işleminin susamın yağ asidi kompozisyonuna (%) etkisi
Table 4. Effect of roasting process on fatty acid composition (%) of sesame

	Kavurulmamış	Konvansiyonel Kavurma (180 °C'de 3 saat)	Sıcak Hava Fritözü (160 °C'de 60 dk)	Sıcak Hava Fritözü (180 °C'de 35 dk)
Palmitik asit (C16:0)	10,34±0,01 ^c	8,82±0,02 ^a	9,12±0,14 ^b	8,87±0,00 ^a
Stearik asit(C18:0)	5,87±0,12 ^b	5,47±0,12 ^a	5,53±0,03 ^a	5,45±0,11 ^a
Araşidik asit(C20:0)	0,62±0,01 ^b	0,50±0,02 ^a	0,46±0,08 ^a	0,51±0,02 ^a
Behenik asit (C22:0)	0,10±0,02 ^a	0,09±0,03 ^a	0,10±0,04 ^a	0,11±0,00 ^a
Lignoserik asit(C24:0)	0,07±0,01 ^a	0,07±0,01 ^a	0,05±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a
Σ	17,00±0,17	14,95±0,20	15,26±0,31	14,99±0,15
Palmitoleik asit(C16:1)	0,10±0,00 ^b	0,06±0,02 ^a	0,05±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a
Oleik asit(C18:1n9c)	42,57±0,17 ^c	38,94±0,32 ^a	40,14±0,02 ^b	38,73±0,08 ^a
cis-11-eikosenoik asit(C20:1)	0,13±0,00 ^a	0,11±0,01 ^a	0,12±0,02 ^a	0,11±0,00 ^a
Σ	42,80±0,17	39,11±0,35	40,31±0,05	38,89±0,09
Linoleik asit(C18:2n6c)	39,93±0,04 ^a	42,79±0,09 ^b	44,18±0,04 ^d	43,03±0,12 ^c
Linolenik asit (C18:3n6)	0,22±0,00 ^{ab}	0,20±0,01 ^a	0,24±0,03 ^b	0,23±0,00 ^{ab}
Σ	40,15±0,04	42,99±0,35	44,42±0,07	43,26±0,12

Ortalama ± Standart Sapma (n = 2). Aynı satırda yer alan harfler (a-d) değerler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.



Şekil 3. Kavrulmuş susamların FTIR spektrumları
Figure 3. FTIR spectra of roasted sesame seeds

Bu iki pikin şiddetinin konvansiyonel yöntemler kavrulan susam ürünlerinde yüksek çıkması bu ürünlerin ikincil oksidatif bileşenler bakımından daha yüksek olduğunu göstermektedir. Benzeri sonuçlar siyah ve beyaz susam (*Sesamum indicum L.*) tanelerinin 200°C'de 15 dk uygulanan infrared ve sıcak hava kavurma yöntemi ürünlerinde de görülmüştür (Sundar ve ark., 2022). Sıcak hava fritözü ile kavurmanın, bu ürünlerin oluşumunu da indirgediği sonucu ortaya çıkmaktadır. 710 cm⁻¹'de görülen ve disüstitü olefinlerin cis-HC = CH grubunun düzlem dışı titreşiminin yanı sıra CH₂ titreşimlerinin üst üste binmesi ile ilişkilendirilen pik ise konvansiyonel kavurma ile 180°C'de 35 dk sıcak hava fritözü ile kavrulan susamlar için benzer bulunmuştur (Ozulku ve ark., 2017; Poiana ve ark., 2015).

Sonuç

Bu araştırmada tahin üretiminde kullanılan kabuğu soyulmuş susam tohumlarının kavrulmasında konvansiyonel yöntem alternatif olarak daha kısa sürede kavurma yapabilen sıcak hava fritözünün etkinliği araştırılmış ve optimizasyonu yapılmıştır. Kavurma işlemi sonunda elde edilen ΔE ve su aktivitesi verilerine göre sıcak hava fritözünün optimum sıcaklığı ve süresi 181.1°C ve 36.7 dk olarak belirlenmiştir. Sıcak hava fritözü ile arzu edilen görsel özellikleri sağlayan renk değişim trendi yakalanarak fabrika kavurma koşullarına benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Kavrulmuş susam örneklerinin kimyasal özellikleri kıyaslandığında sıcak hava fritözünden elde edilen ürünlerin ham yağ veriminin konvansiyonel yöntemle göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ürünlerin oksidasyon stabilitesi hakkında bilgi veren peroksit değerleri en düşük sıcak hava fritözünde 180°C de 35 dk kavrulan örneklerde tespit edilmiştir. Sıcak hava fritözü ile daha kısa sürede kavurma işleminin gerçekleştiği susam tohumlarının yağ asidi kompozisyonunda palmitik asit ve linolenik asit artışı haricinde önemli bir değişim olmamıştır. FTIR sonuçlarına göre kavurma işlemi sıcak hava fritözü ile yapıldığında konvansiyonel yöntem ile

benzer kimyasal bileşen kompozisyonunun elde edilmesi son ürün kalite kriterleri açısından önemli bir farklılığın oluşmadığını göstermektedir. Ancak sıcak hava fritözü ile kavurma işlemi, susamın oksidasyona duyarlılığını ve FTIR sonuçlarında da belirlendiği üzere ikincil peroksit bileşenlerinin oluşumunu indirgediği için depolama stabilitesi daha yüksek tahin üretimine katkı sağlanması beklenmektedir. Sonuç olarak sıcak hava fritözü ile kavurma işlemi, hızlı ve enerji maliyeti daha düşük alternatif bir yöntem olarak önerilebilir.

Bilgi

Yazar Katkı Beyanı

Mustafa Şamil ARGUN: Kavramsallaştırma, veri toplama, analizlerin yapılması, verilerin analizi, orijinal taslağın yazılması, inceleme ve düzenleme

Abdullah KURT: Kavramsallaştırma, metodoloji, veri toplama, analizlerin yapılması, verilerin analizi, orijinal taslağın yazılması, inceleme ve düzenleme

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür

Çalışmamıza verdiği desteklerinden dolayı Konya ili Akşehir ilçesinde faaliyet gösteren Ak-Hel Helva-Tahin firmasına ve Hüseyin KESKİN'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abib, B., Afifi, S. M., El-Din, M. G. S., & Farag, M. A. (2023). How do cultivar origin and stepwise industrial processing impact *Sesamum indicum* seeds' metabolome and its paste and in relation to their antioxidant effects? A case study from the sesame industry. *Food chemistry*, 420, 136134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136134>
- Abu-Jdayil, B., Al-Malah, K., & Asoud, H. (2002). Rheological characterization of milled sesame (tehneh). *Food Hydrocolloids*, 16(1), 55-61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00040-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00040-6)

- Akpınar, K. (2017). Susam bitkisinin (*Sesamum indicum* L.) Kahramanmaraş ekolojisinde agronomik ve teknolojik özelliklerinin incelenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş.
- Alimentarius, J. F. W. C. (1992). *Codex alimentarius*. Food & Agriculture Org.
- Amrein, T. M., Andres, L., Schönbacher, B., Conde-Petit, B., Escher, F., & Amadò, R. (2005). Acrylamide in almond products. *European Food Research and Technology*, 221, 14-18.
- Anese, M., & Suman, M. (2013). Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 51(1), 257-264.
- Arslan, F. N., Şapçı, A. N., Duru, F., & Kara, H. (2017). A study on monitoring of frying performance and oxidative stability of cottonseed and palm oil blends in comparison with original oils. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 704-717. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1177544>
- Asghar, A., Majeed, M. N., & Akhtar, M. N. (2014). A review on the utilization of sesame as functional food. *American Journal of Food and Nutrition*, 4(1), 21-34.
- Berk, E., Hamzaloğlu, A., & Gökmen, V. (2020). Multiresponse kinetic modelling of 5-hydroxymethylfurfural and acrylamide formation in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds during roasting. *European Food Research and Technology*, 246, 2399-2410.
- Bi, Y. (2005). Oil chemistry. In: Chemical industry press.
- Choudhary, A., Kumar, V., Kumar, S., Majid, I., Aggarwal, P., & Suri, S. (2021). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: Recent developments. *Toxin Reviews*, 40(4), 545-561.
- Çaçan, E., Kutlu, M. A., Uçar, R., Özdemir, S., Kökten, K., Mokhtarzadeh, S., & Ekmekçi, M. (2023). Comparison of Honey, Pollen And Propolis Amounts And Honey Quality Obtained From Bee Pasture and Highland. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 23(2), 190-201.
- Durmuş, S., & Mercan, E. (2019). Hava Sirkülasyonlu Fırın, Mikrodalga ve Halojen Lamba ile Kavrmanın Susamda *Salmonella* İnaktivasyonu ve Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22, 212-221.
- El-Beltagi, H. S., Maraai, R. W., El-Ansary, A. E., Rezk, A. A., Mansour, A. T., & Aly, A. A. (2022). Characterizing the Bioactive Ingredients in Sesame Oil Affected by Multiple Roasting Methods. *Foods*, 11(15), 2261. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/15/2261>
- FAO, W. (1994). Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation organised by the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Rome, 19-26.
- Gharby, S., Harhar, H., Bouzoubaa, Z., Asdadi, A., El Yadini, A., & Charrouf, Z. (2017). Chemical characterization and oxidative stability of seeds and oil of sesame grown in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 105-111.
- Gonfa, L. (1996). Climate classifications of Ethiopia.
- Gotoh, N., & Wada, S. (2006). The importance of peroxide value in assessing food quality and food safety. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(5), 473.
- Gökmen, V., Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N., & Mogol, B. A. (2012). Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine. *Food Chemistry*, 132(1), 168-174.
- He, S., Pan, T., Zhang, Z., Wu, Y., Sun, H., Ma, Y., & Zhang, Y. (2023). Interactive effect of hot air roasting processes on the sensory property, allergenicity, and oil extraction of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Grain & Oil Science and Technology*, 6(2), 71-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gaost.2023.02.001>
- Ji, J., Liu, Y., Shi, L., Wang, N., & Wang, X. (2019). Effect of roasting treatment on the chemical composition of sesame oil. *Lwt*, 101, 191-200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.008>
- Jin, L., Guo, Q., Zhang, M., Xu, Y.-T., Liu, H.-M., Ma, Y.-X., Wang, X.-D., & Hou, L.-X. (2022). Effects of non-lipid components in roasted sesame seed on physicochemical properties of sesame paste. *Lwt*, 165, 113745. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113745>
- Kahyaoglu, T., & Kaya, S. (2006). Modeling of moisture, color and texture changes in sesame seeds during the conventional roasting. *Journal of Food Engineering*, 75(2), 167-177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.011>
- Kaplan, K. (2022). *Konvansiyonel ve organik tahin üretimi sırasında bazı fizikokimyasal özelliklerdeki değişimlerin incelenmesi* Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi].
- Kaur, A., Singh, B., Kaur, A., Yadav, M. P., & Singh, N. (2021). Impact of intermittent frying on chemical properties, fatty acid composition, and oxidative stability of 10 different vegetable oil blends. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16015.
- Kowalski, S., Lukaszewicz, M., Duda-Chodak, A., & Zięć, G. (2013). 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)—heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation—a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 63(4), 207-225.
- Lukurugu, G. A., Nzunda, J., Kidunda, B. R., Chilala, R., Ngamba, Z. S., Minja, A., & Kapinga, F. A. (2023). Sesame production constraints, variety traits preference in the Southeastern Tanzania: Implication for genetic improvement. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100665>
- Mohamed Ahmed, I. A., Musa Özcan, M., Uslu, N., Juhaimi, F. A., Osman, M. A., Alqah, H. A., Ghafoor, K., & Babiker, E. E. (2020). Effect of microwave roasting on color, total phenol, antioxidant activity, fatty acid composition, tocopherol, and chemical composition of sesame seed and oils obtained from different countries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14807.
- Mohamed Ahmed, I. A., Musa Özcan, M., Uslu, N., Juhaimi, F. A., Osman, M. A., Alqah, H. A. S., Ghafoor, K., & Babiker, E. E. (2020). Effect of microwave roasting on color, total phenol, antioxidant activity, fatty acid composition, tocopherol, and chemical composition of sesame seed and oils obtained from different countries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.14807>
- Mohamed Ahmed, I. A., Uslu, N., Musa Özcan, M., Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Osman, M. A., & Alqah, H. A. S. (2021). Effect of conventional oven roasting treatment on the physicochemical quality attributes of sesame seeds obtained from different locations. *Food Chemistry*, 338, 128109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128109>
- Mohammed, F., Abdulwali, N., Guillaume, D., Tenyang, N., Ponka, R., Al-Gadabi, K., Bchitou, R., Abdullah, A. H., & Naji, K. M. (2018). Chemical composition and mineralogical residence of sesame oil from plants grown in different Yemeni environments. *Microchemical Journal*, 140, 269-277.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 415-424.
- Neme, K., Tola, Y. B., Mohammed, A., Tadesse, E., Shaheen, F., Ahmed, S., Jahan, H., Kaiser, S., & Müller, F. (2023). Effect of seed processing treatments on oil quality of Ethiopian sesame varieties. *CyTA - Journal of Food*, 21(1), 31-40. <https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2154394>
- Ng, S., Lasekan, O., Muhammad, K., Sulaiman, R., & Hussain, N. (2014). Effect of roasting conditions on color development and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) analysis of Malaysian-grown tropical almond nuts (*Terminalia catappa* L.). *Chemistry Central Journal*, 8, 1-11.

- Ozulku, G., Yildirim, R. M., Toker, O. S., Karasu, S., & Durak, M. Z. (2017). Rapid detection of adulteration of cold pressed sesame oil adulterated with hazelnut, canola, and sunflower oils using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometric. *Food Control*, 82, 212-216.
- Özalp, C. (2019). Kabuklu kavrulmuş susam ve tahin yağlarının yağ asidi kompozisyonu ve renk değerleri üzerine kavurma süresinin etkisi.
- Özcan, M. (1993). Susam, susam yağı ve tahinde fiziksel kimyasal analizler ve yağ asitleri bileşiminin belirlenmesi.
- Özcan, M., & Akgül, A. (1995). Susam tohumu ve yağının bazı bileşim özellikleri. *Türk Tarım ve Ormanlık Dergisi*, 19, 59.
- Pastoriza de la Cueva, S., Álvarez, J., Végvári, Á., Montilla-Gómez, J., Cruz-López, O., Delgado-Andrade, C., & Rufián-Henares, J. A. (2017). Relationship between HMF intake and SMF formation in vivo: An animal and human study. *Molecular nutrition & food research*, 61(3), 1600773.
- Pellet, P., & Shadarevian, S. (1970). Food composition tables for use in the Middle East, American University of Beirut. Library of congress catalogue,
- Poiana, M.-A., Alexa, E., Munteanu, M.-F., Gligor, R., Moigradean, D., & Mateescu, C. (2015). Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment. *Open Chemistry*, 13(1), 000010151520150110.
- Rahman, A., Bhattarai, S., Akbar, D., Thomson, M., Trotter, T., Timilsina, S., & Australia, C. (2020). Market analysis of sesame seed. CQUniversity. Report. DOI: <https://doi.org/10.25946/15079245.v1>.
- Saklar, S., Katnas, S., & Ungan, S. (2001). Determination of optimum hazelnut roasting conditions. *International journal of food science & technology*, 36(3), 271-281.
- Sarion, C., Codinã, G. G., & Dabija, A. (2021). Acrylamide in bakery products: A review on health risks, legal regulations and strategies to reduce its formation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8), 4332.
- Sawaya, W. N., Ayaz, M., Khalil, J. K., & Al-Shalhat, A. F. (1985). Chemical composition and nutritional quality of tehneh (sesame butter). *Food chemistry*, 18(1), 35-45.
- Shaker, M. A. (2014). Air frying a new technique for produce of healthy fried potato strips. *J. Food Nutr. Sci*, 2(4), 200-206.
- Sundar, S., Singh, B., Kaur, A., & Yadav, M. P. (2022). Impact of infrared and dry-air roasting on antioxidant potential, oxidative stability, chemical characteristics, and fatty acid profile of black and white sesame (*Sesamum indicum* L.) oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12), e17252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.17252>
- Şahin, G. (2014). TÜRKİYE'DE ÜRETİMİ AZALAN ÖNEMLİ BİR YAĞ BİTKİSİ SUSAM. *Itobiad: Journal of the Human & Social Science Researches*, 3(2).
- Şimşek, E. (2009). Farklı kavurma tekniklerinin bazı yağlı tohum yağlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine etkisi.
- Tenyang, N., Ponka, R., Tiencheu, B., Djikeng, F. T., Azmeera, T., Karuna, M. S. L., Prasad, R. B. N., & Womeni, H. M. (2017). Effects of boiling and roasting on proximate composition, lipid oxidation, fatty acid profile and mineral content of two sesame varieties commercialized and consumed in Far-North Region of Cameroon. *Food Chemistry*, 221, 1308-1316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.025>
- Teruel, M. d. R., Gordon, M., Linares, M. B., Garrido, M. D., Ahromrit, A., & Niranjana, K. (2015). A comparative study of the characteristics of French fries produced by deep fat frying and air frying. *Journal of Food Science*, 80(2), E349-E358.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., & Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica chimica acta*, 573, 459-465.
- Zaghi, A. N., Barbalho, S. M., Guiguer, E. L., & Otoboni, A. M. (2019). Frying Process: From Conventional to Air Frying Technology. *Food Reviews International*, 35(8), 763-777. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600541>
- Zebib, H., Bultosa, G., & Abera, S. (2015). Physico-chemical properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties grown in Northern Area, Ethiopia. *Agricultural Sciences*, 6(02), 238.
- Zhang, N., Li, Y., Wen, S., Sun, Y., Chen, J., Gao, Y., Sagymbek, A., & Yu, X. (2021). Analytical methods for determining the peroxide value of edible oils: A mini-review. *Food chemistry*, 358, 129834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129834>



Effects of Ultrasound Application on the Improvement of Probiotic Properties and Antioxidant Activity of *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*

Hamza Goktas^{1,a,*}, Demet Turali^{1,b}, Cansu Agan^{1,c}, Osman Sagdic^{2,d}

¹Istinye University, Vocational School, Food Technology Programme, 34010, Istanbul, Türkiye

²Yildiz Technical University, Chemical and Metallurgical Faculty, Food Engineering Department, 34210, Istanbul, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Research Article

Received : 19.07.2024

Accepted : 07.08.2024

Keywords:

Ultrasound

Yeast

Probiotic properties

Antioxidant activity

In vitro survival

The objective of this study was to ascertain the impact of ultrasound application on the probiotic characteristics and antioxidant activity of yeasts. In this context, the pH changes, probiotic properties and antioxidant activities of *K. marxianus* (Km), *S. boulardii* (Sb) and *S. cerevisiae* (Sc) were determined by ultrasound application at different durations (5, 15, 30 and 60 minutes at 24 kHz). The lowest pH values were determined for cultures of Km (ultrasound non-applied *K. marxianus*), Sb-30 (30 min. ultrasound applied *S. boulardii*) and Sc-5 (5 min. ultrasound applied *S. cerevisiae*) as 4.48, 5.15 and 5.26, respectively. The hydrophobicity values of the yeast strains varied between 6% and 24%, increased with ultrasound application. Although *S. boulardii* had the highest tolerance to low pH and bile salts, the resistance of all yeast to low pH and bile salts decreased with ultrasound application. *K. marxianus* had the least survival under *in vitro* conditions, but ultrasound application increased survival of *K. marxianus* strains and slightly affected the survival rate of *S. boulardii* and *S. cerevisiae*. Increasing of duration time of ultrasound application resulted higher antioxidant activity and so the highest antioxidant activity was determined for Sb-60. Finally, ultrasound application could be used for the development of hydrophobicity and antioxidant properties of yeast cultures.

^a hamzagoktas@yandex.com

^b <https://orcid.org/0000-0001-9802-9378>

^b demetturali@icloud.com

^b <https://orcid.org/0009-0008-1973-3315>

^c cagan@istinye.edu.tr

^c <https://orcid.org/0000-0001-9043-8767>

^d sagdic@gmail.com

^d <https://orcid.org/0000-0002-2063-1462>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Live microorganisms that have positive effect on human health are defined as probiotics (Hotel & Cordoba, 2001). Microorganisms should have some major qualifications like aggregation and adhesion abilities, resistance to harsh conditions and non-pathogenic to be used as probiotic (Gut et al., 2018). Although most of the studies on probiotic microorganism are related to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species (Holzapfel, 2006), some yeast species have also indicated probiotic properties including *Saccharomyces boulardii* (Tomičić et al., 2016), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida krusei*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentase* and *Pichia kudriavzevii* (Kumura et al., 2004; Saber et al., 2017a; Saber et al., 2017b).

Yeasts are eukaryotic microorganisms that have probiotic properties and used as starter or co-cultures in food and biotechnology field and have varied utilization

like enzyme industry, pharmaceutical and biotechnology (Sadeghi et al., 2022). Previous studies have demonstrated the probiotic properties of yeasts isolated from a variety of fermented foods, including kefir and cereal-based products (Goktas et al., 2021b; Greppi et al., 2017; Gut et al., 2019). *Saccharomyces cerevisiae* is used as the main fermentation starter culture in the production of alcoholic beverages such as bakery products, distilled spirits, fermented fruit juices and wine. *S. boulardii* is a close relative of *S. cerevisiae* and numerous products are present in the probiotic market containing *S. boulardii* strains as a probiotic agent (Goktas et al., 2021a).

Ultrasound is mostly described as voice of frequency above that to which the human lug be able to answer (Ojha et al., 2017). Ultrasound is applied in the fields of food technology, sonochemistry and medical diagnostic and expressed as green technology (Speranza et al., 2020). Ultrasound technology was firstly applied to investigation of its effect on killing cells in food applications, but in

recent years it has been applied on some biotechnological processes without affecting the cell (Speranza et al., 2020). Many studies have reported that low-intensity ultrasound technology creates repairable harm to cells, alters their viability, and as a result accelerates their proliferation and metabolism (Speranza et al., 2020).

A number of studies have been conducted which examine the effect of ultrasound technology on the properties of yeasts. For example, Lanchun et al., (2003) and Borah et al., (2019) have demonstrated that ultrasound technology has the capacity to enhance the growth characteristics and fermentation kinetics of *S. cerevisiae*. In a separate study, Al Daccache et al., (2020) demonstrated that ultrasound technology reduced the fermentation time of wine and beer and increased ethanol yield. Additionally, Speranza et al., (2020) indicated that the utilisation of ultrasound enhanced the technological attributes of *S. cerevisiae*. Similarly, effect of ultrasound technology on some probiotic properties of lactic acid bacteria was investigated. Ultrasound has promoted the growth of two different strains of *L. plantarum* and improved bioactive properties during fermentation (Hashemi and Gholamhosseinpour, 2020), increased the growth of *L. casei* strains and positively affected the probiotic properties (Yeo & Liong, 2013), and also hydrophobicity and adhesion to Caco-2 cells of *L. reuteri* (Racioppo et al., 2017). The effects of ultrasound application on microorganisms are associated with the formation of pores in the cell wall, an increase in extracellular metabolites and a disruption of protein structures.

The yeast cell wall is a rich source of β -glucan. Furthermore, the yeast cell wall contains a number of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase. The antioxidant activity of yeast is attributable to these components (Goktas et al., 2021b). Gholamhosseinpour & Hashemi (2019) reported that the application of ultrasound during the process of milk fermentation resulted in an increase in antioxidant activity. In a separate study, Hashemi & Gholamhosseinpour (2020) demonstrated that the application of ultrasound technology enhanced the bioactive properties of goat milk.

Although various studies reported the effect of ultrasound technology on the probiotic properties of lactic acid bacteria, limited number of studies reported for yeast species. So, in this study, the effects of ultrasound treatment on auto-aggregation, hydrophobicity, resistance to low pH, bile salts and *in vitro* conditions, resistance to some fungal antibiotic agents and antioxidant activity of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were investigated. The objective of this study was to investigate the effect of ultrasound treatment on the probiotic properties and antioxidant activity of yeasts.

Material and methods

Yeast Species and Applying Ultrasound Treatment

In this study, *S. boulardii* S10, *K. marxianus* KY-2 and *S. cerevisiae* KY-15 strains, which were isolated in our previous studies and had the best probiotic properties, were selected to determine the effect of ultrasound treatment on their probiotic properties (Goktas et al., 2021a; Goktas et

al., 2021b). Yeast extract peptone dextrose (YPD) Broth medium (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L and dextrose 20 g/L, Difco, USA) was used to propagate yeast cultures. Overnight yeast cultures were inoculated into fresh YPD broth medium at a rate of 1% to apply ultrasound treatment. YPD broth medium inoculated with yeast cultures were placed in an ultrasonic water bath. Ultrasound treatment was performed at 24 kHz and four different times, 5, 15, 30 and 60 minutes. Ultrasound-treated yeast cultures were incubated at 30°C for 24 h and pellets were collected by centrifugation at 7000 rpm for 15 minutes at 4°C. Finally, stock cultures were created by adding 20% glycerol and stored at -80°C until used in probiotic and antioxidant analyses. The following abbreviations are employed in the Results and Discussion sections of the article: Km: Ultrasound non-applied *K. Marxianus*, Km-5: 5 min. Ultrasound applied *K. Marxianus*, Km-15: 15 min. Ultrasound applied *K. Marxianus*, Km-30: 30 min. Ultrasound applied *K. Marxianus*, Km-60: 60 min. Ultrasound applied *K. Marxianus*, Sb: Ultrasound non-applied *S. boulardii*, Sb-5: 5 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-15: 15 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-30: 30 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-60: 60 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sc: Ultrasound non-applied *S. cerevisiae*, Sc-5: 5 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-15: 15 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-30: 30 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-60: 60 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*.

Determination of the Growth Curves and pH Changes During Incubation Period

The growth curves and pH changes of yeast cultures were determined during the 24 h incubation period at 30°C. Briefly, the optical density (OD₆₀₀) values of the twice-activated yeast cultures were set to 1.0 and inoculated at 2% in 100 mL of YPD broth medium. Absorbance values of the cultures were measured (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) at 600 nm by taking 5 mL of the relevant medium at 4-hour intervals. Also, pH values were measured by using a pH meter at 22°C. The growth graphs and pH changes graphs of the cultures were created using the absorbance values and pH values against incubation time, respectively.

Auto-aggregation Profile

Auto-aggregation profile of the yeast cultures was performed on the Unban et al., (2021) methodology, with slightly modifications. Overnight cultures were centrifuged at 4 °C and 7000 rpm for 10 min, washed twice with Phosphate buffered saline (PBS) and 10 mL of the PBS were added to pellets. The mixtures were homogeneously vortexed and 1 mL of the cell mixture was measured by spectrophotometer at 600 nm (A₀). Then, the mixtures were incubated without shaking for 24 h at 37 °C and absorbance values of the mixture's upper phase was measured for 2, 4 and 24 h (A_t). Using following equation auto-aggregation percentage of the yeast cultures was determined:

$$\% = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

where A₀ is the absorbance at 0 h, and A_t is the absorbance at 2, 4 and 24 h.

Hydrophobicity Profile

Hydrophobicity profile of the yeast cultures was determined with regard to adhesion to hydrocarbons, with a method presented by Vinderola & Reinheimer (2003). Overnight yeast cultures were centrifuged at the above centrifugal condition, washed twice with 50 mM K₂HPO₄ and suspended with same solution. Absorbance values of the cell suspension were set to 1.0 at 600 nm and then absorbance values of the suspension were recorded at 560 nm (A₁). Three mL of the cell suspension were mixed with 0.6 mL *n*-hexadecane, vortexed for 2 min. and incubated at 37 °C for 20 min. After the incubation, upper aqueous phase carefully taken out and absorbance values were recorded at 560 nm (A₂). Hydrophobicity profile was calculated with following mathematical expression:

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100.$$

Resistance to Low pH and Bile Salts

To determine resistance to low pH previously defined methodology was used with some modifications (Argyri et al., 2013). Briefly, overnight yeast cultures were centrifuged at above centrifugation conditions, washed twice with PBS and resulting pellet resuspended into PBS. The suspension was adjusted to 1.0 at OD₆₀₀ nm. 0.1 mL of the suspension was inoculated into 10 mL of PBS medium adjusted to pH 2 using 1M hydrochloric acid, vortexed and incubated for 3 h at 37 °C. The number of viable cells was counted on YPD agar medium after incubated at 30°C for 48 h and results were expressed as log Colony Forming Unit/mL (CFU/mL). An inoculation was created from OD₆₀₀ adjusted cultures on YPD agar as mentioned above for forming control groups.

Resistance to bile salts of yeast cultures was determined with a method (García-Hernández et al., 2016). 0.1 mL of the OD₆₀₀ adjusted yeast cultures were inoculated to 10 mL of the PBS containing 0.3% bile salts, vortexed and incubated for 3 h at 37 °C. Control groups were created as mentioned above and all cultures were inoculated on YPD agar, incubated at 30°C for 48 h. Finally, the number of viable cells was expressed as log CFU/mL.

Resistance to Fungal Antibiotic Agents

Antibiotic resistance of yeast cultures against some antibiotics were determined with a method specified by Goktas et al., (2021b). OD₆₀₀ values of activated yeast cultures were adjusted to 1.0 at 600 nm and 100 uL of the each culture was spread on the YPD agar. Amphotericin B (AMB, 20 mcg), clotrimazole (CLT, 10 mcg), flucanazole (FLU, 25 mcg), ketoconazole (KTC, 10 mcg), nystatin (NY, 100 U) (Bioanalyse, Türkiye) were placed on the agar medium containing yeast cultures. After the incubation at 37°C for 24 h, formed zone areas measured and results were expressed as in mm.

Resistance to In vitro Conditions

Resistance to *in vitro* conditions of yeast cultures was determined as defined by Minekus et al., (2014). An overnight yeast cultures were centrifuged at above centrifugation conditions, washed twice with PBS and the OD₆₀₀ of the suspension was set to 1.0 with a final volume of 10 mL. 0.1 mL of the this suspension was spread on YPD agar to represent the control group, incubated at 30°C

for 48 h and counted. Further steps of resistance to *in vitro* conditions were performed as in the Figure 1. Furthermore, the survival rates of the yeast cultures were calculated in accordance with the specified equations:

$$GS = \frac{(\text{Control log CFU/mL}) - \text{Gastric log CFU/mL}}{\text{Control log CFU/mL}} \times 100$$

$$PS = \frac{(\text{Gastric log CFU/mL}) - \text{Pancreatic log CFU/mL}}{\text{Gastric log CFU/mL}} \times 100$$

$$OS = \frac{(\text{Control log CFU/mL}) - \text{Pancreatic log CFU/mL}}{\text{Control log CFU/mL}} \times 100$$

GS : Gastric Survival (%)

PS : Pancreatic Survival (%)

OS : Overall Survival (%)

Antioxidant Activity

Antioxidant activity of the yeast cell free supernatant was determined according to the method described by Unban et al., (2021) with some modifications. Activated yeast cultures were centrifuged at above centrifugation procedure and supernatants carefully collected with a syringe and filtered through a 0.45 um filters and 0.4 ml of the supernatant was transferred to into new tubes. 0.8 mL of the freshly prepared 0.2 mM of DPPH solution (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) in 80% methanol was mixed with filtered supernatant, vortexed for 30 s and incubated at room temperature in darkness for 20 min. Absorbance values of the mixes were recorded at 517 nm (A₂). YPD broth without inoculation of yeast cultures was used as control (A₁). Antioxidant activity of the yeast cultures was determined with following mathematical model:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

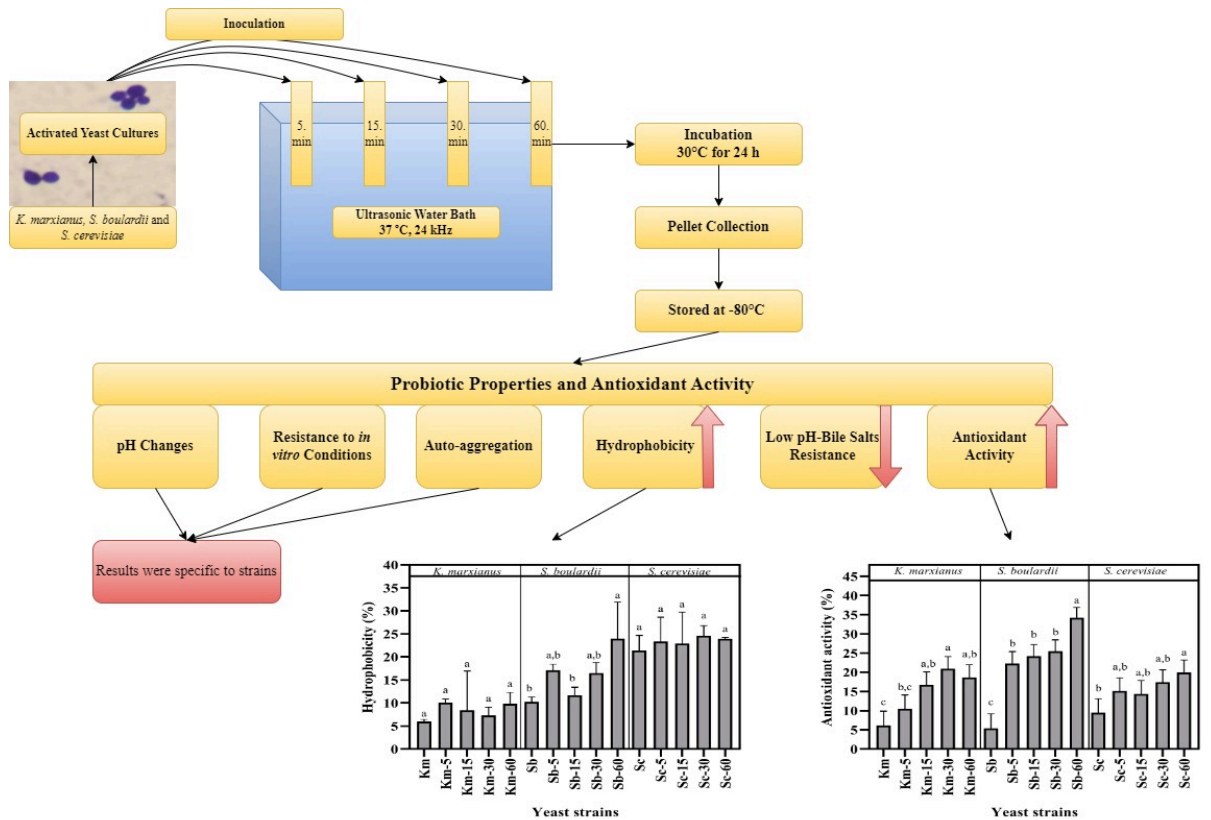
Statistical Analyses

All analyses were carried out duplicate and results were expressed as mean plus standart deviation. Statistical differences were determined with Student's t test at 95% importance level by using statistical programme of JMP software.

Results and Discussion

Growth Curves and pH Changes

Growth curves of ultrasound applied and non-applied strains of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were presented in the Figure 2. Generally, strains showed similar growth curves during incubation period. Km-5 showed slowly growth compared to control *K. marxianus* strain during incubation period and the growth curve of Km-5 remained under control strain. Similarly, Sc-5 and Sc-30 showed slower growth than the control *S. cerevisiae* strain. Also, pH changes of ultrasound applied and non-applied strains of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were determined during incubation period (Table 1). There was no significant change in pH values in the first inoculation of yeast strains into the growth medium. At the end of the 24-hour incubation, the lowest pH values were determined as 4.48, 5.15 and 5.26 for Km, Sb-30 and Sc-5, respectively.



Graphical Abstract

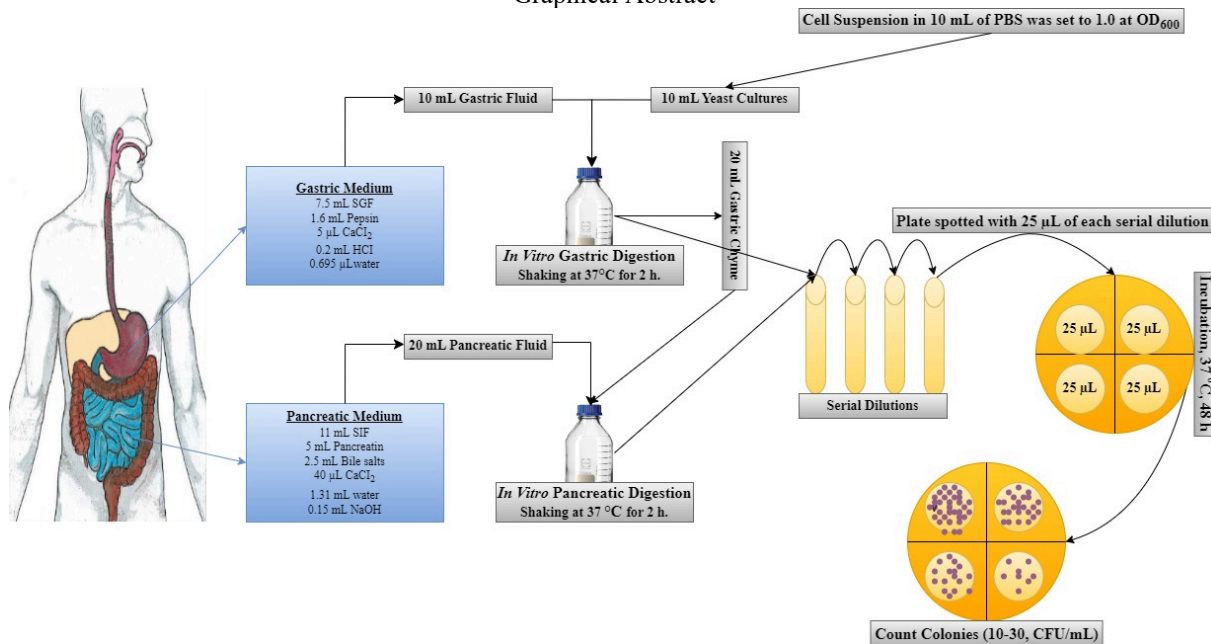


Figure 1. Schematic representation of determination of *in vitro* resistance of yeast strains.

Ultrasound application caused different pH changes for *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae*. At the end of the incubation, the pH values of Km-5, Km-15, Km-30 and Km-60 were found to be higher than Km and the highest pH value was determined for Km-5 due to the showed slower growth as seen in the growth curve. However, ultrasound non-applied strain of *S. boulardii* (Sb) had the higher pH value than ultrasound applied strains of *S. boulardii* (Sb-5, Sb-15, Sb-30 and Sb-60) and ultrasound application resulted lower pH values for *S. boulardii* strains. As stated above, a regular increase or decrease for pH values could not be determined for *S. cerevisiae*. The

pH value of Sc-60 was higher than Sc, while the pH value of Sc-5 was found to be lower. This showed that ultrasound application caused different pH changes for these three yeasts at the end of incubation.

Auto-Aggregation

Auto-aggregation is one of the desirable probiotic properties in probiotic selection, as it reflects adhesion to the intestinal tract of the host. Auto-aggregation profile of the ultrasound applied and non-applied strains of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were presented in the Figure 3.

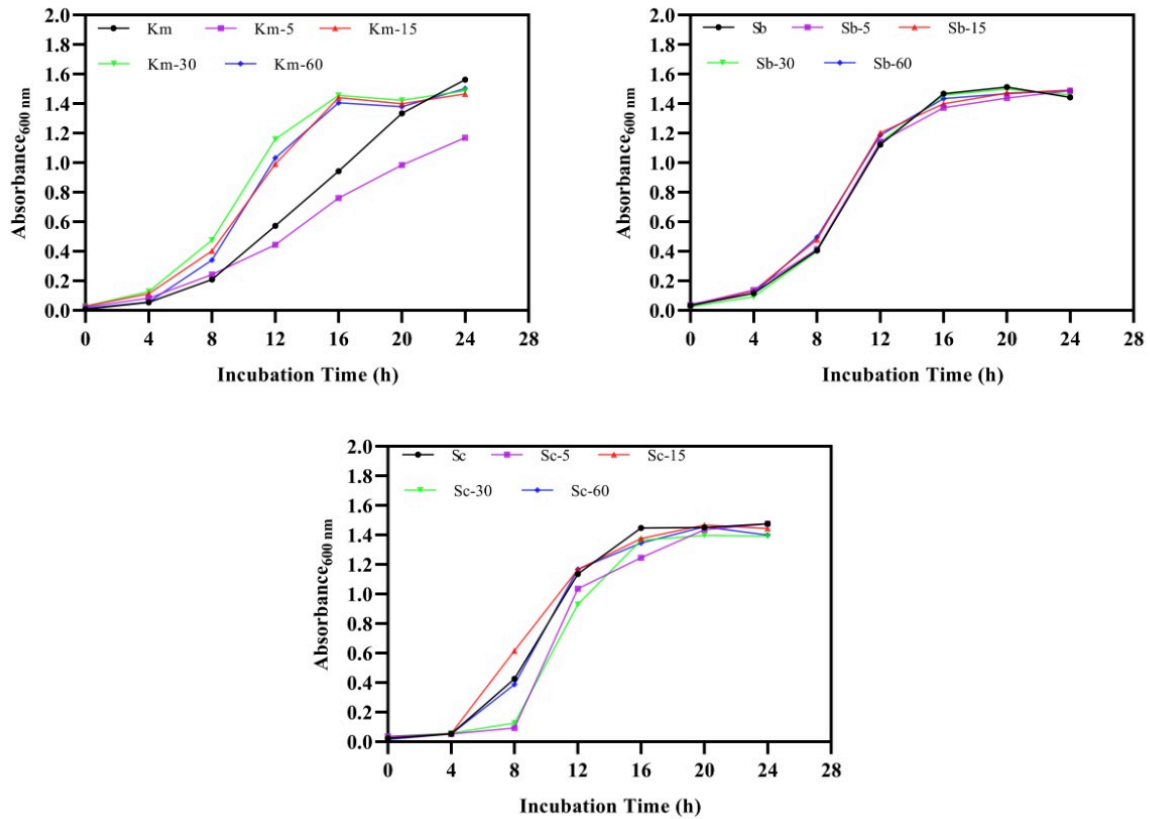


Figure 2. Growth curves of ultrasound applied and non-applied yeast strains

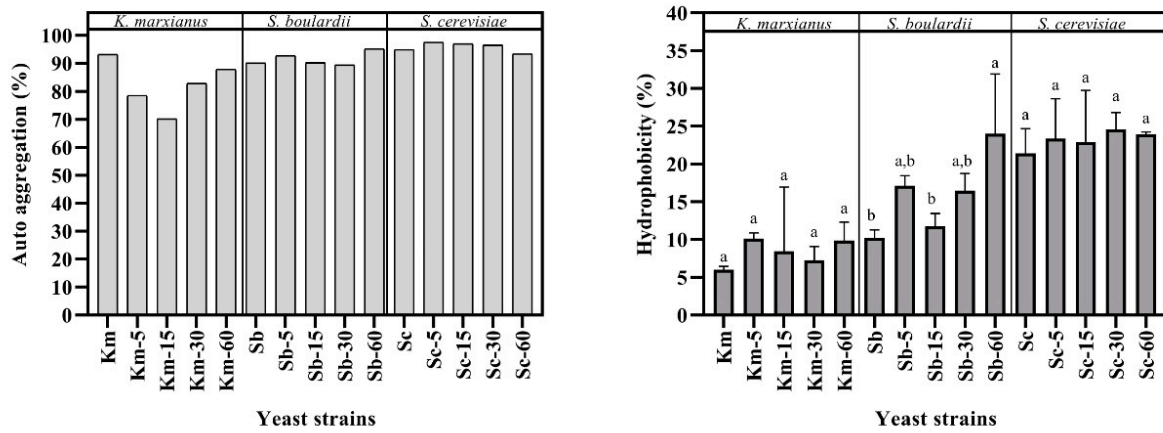


Figure 3. Auto aggregation profile and Hydrophobicity of ultrasound applied and non-applied yeast strains.

All yeast genus of ultrasound non-applied have shown a great auto aggregation profile more than 90% for 2h. However, ultrasound application has revealed different auto-aggregation profile for yeast strains. Auto-aggregation profile of the *K. marxianus* strains decreased with ultrasound application compared to control. The auto-aggregation profile of *S. boulardii* strains increased with 5 and 60 minutes of ultrasound treatment, but decreased with 15 and 30 minutes of ultrasound treatment and was higher than the control. Auto-aggregation profiles of *S. cerevisiae* strains increased with 5, 15 and 30 min ultrasound treatment but slightly decreased with 60 min ultrasound treatment. Ultrasound application created different auto-aggregation profiles for different yeasts. Especially for *S. boulardii* and *S. cerevisiae*, 5 min. ultrasound application increased the auto-aggregation profiles of the

strains. 5 min. ultrasound application reduced the auto-aggregation profiles of *K. marxianus* strains. It was reported that ultrasound application affected the auto-aggregation profile of some *S. cerevisiae* strains, while not affected some strains (Speranza et al., 2020). Giordano & Mauriello (2023) stated that 6 and 8 minutes ultrasound application was reduced the auto-aggregation ability of *L. casei* strains by 20 fold. It is possible that ultrasound has affected the cell membrane of yeasts, resulting in alterations to their aggregation properties. These findings revealed that the application of ultrasound may affect the auto-aggregation profiles of different microorganisms at different levels and the applied time should be taken into account, and also ultrasound application may be specific to the microorganism.

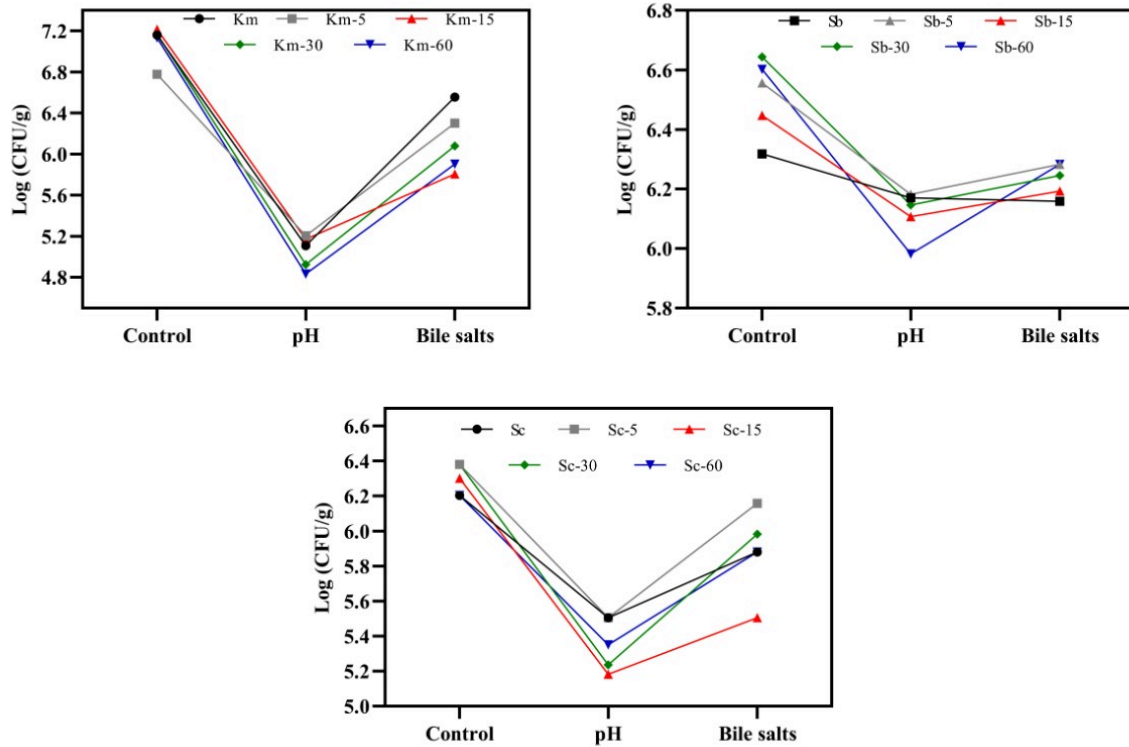


Figure 4. Resistance to low pH and Bile salts conditions of ultrasound applied and non-applied yeast strains.

Hydrophobicity

Hydrophobicity is another *in vitro* probiotic property that reflects the ability of microorganisms to adhere to the intestinal mucosa. As seen in the Figure 3, the hydrophobicity values of the yeast strains varied between 6% and 24%. The lowest hydrophobicity values among all yeast strains were determined for *K. marxianus* and the values were below 10%. However, different hydrophobicity values were recorded for *S. boulardii* strains and the values varied between 10% and 24%. The hydrophobicity values of *S. cerevisiae* strains were found to be over 20% and the highest values were determined for *S. cerevisiae* strains, except *S. boulardii* strain, which was treated ultrasound for 60 min. Ultrasound treatment affected the hydrophobicity values of the yeast strains and the hydrophobicity values for all applied times increased in all three yeast strains compared to the control. 5 and 60 minutes of ultrasound treatment for *K. marxianus* and *S. boulardii* increased the hydrophobicity values of these two yeast strains more than 1.5 fold. Although ultrasound treatment increased the hydrophobicity values of *S. cerevisiae* strains, this increase was not as high as in *K. marxianus* and *S. boulardii*, and was a more limited increase recorded. It has been demonstrated that ultrasound has an impact on the cell membrane of microorganisms (Yeo & Liong, 2013). Consequently, the application of ultrasound caused in a modification of the yeast cell membranes, which in turn led to alterations in the hydrophobic properties. It has been stated in the literature that ultrasound application increased the hydrophobicity values of *L. casei* (Giordano & Mauriello, 2023), *P. freudenreichii* and *A. jensenii* (Bevilacqua et al., 2019) and *L. reuteri* (Racioppo et al., 2017), decreased the hydrophobicity value of *L. plantarum*, but had no effect on *Bifidobacterium* strains (Racioppo et al., 2017). Physical

processes or chemical substances can affect the hydrophobicity properties of microorganisms (Racioppo et al., 2017) and ultrasound application affected the hydrophobicity values of microorganisms at different levels, both as in our study and as reported in the literature, and this difference also changed according to the strain.

Resistance to Low pH and Bile Salts

A probiotic candidate must be live at low pH before arriving the gut to offer its healthy effects. During digestion, stomach acidity can decrease to values at pH 1.5, so probiotic viability is important (Yeo & Liong, 2013). At low pH and bile salts conditions, viability of the ultrasound applied and non-applied yeast strains were affected and a decreasing was observed for all strains viability (Figure 4). Increasing of ultrasound application time resulted higher decrease in the viability of all yeast strains at low pH and bile salts conditions compared to control, except Km-5. The least viability was determined for *K. marxianus* strains and increasing of ultrasound application time resulted approximately 2 log units decrease in viability of *K. marxianus* strains, except Km-5. For strains of the Km, Km-5, Km-15, Km-30 and Km-60, a decrease of 2.05, 1.57, 2.04, 2.24 and 2.30 log units occurred, respectively, at pH=2. Increasing ultrasound application time similarly resulted decrease in the viability of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* strains and approximately 1 log unit decrease was determined for viability of *S. cerevisiae* strains at pH 2, while less than 1 log unit decrease was determined for viability of *S. boulardii* strains. And so, *S. boulardii* strains were the most resistant to low pH among these three yeasts.

Similarly, a decrease in the viability of ultrasound applied and non-applied yeast strains were detected in the bile salts conditions and increasing duration of ultrasound application resulted decreasing viability of yeast strains.

For viability of *K. marxianus* strains approximately 1 log unit decrease was determined. However, viability of *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were better than *K. marxianus* strains in the bile salts conditions and less than 1 log unit decrease was determined for viability of both two yeasts. In summary, the application of ultrasound affected the low pH and bile salt tolerance of the yeasts, and increasing the duration of ultrasound application resulted decreasing in the viability of the yeast strains.

Racioppo et al., (2017) reported that ultrasound application affected the viability of *L. reuteri*, *L. plantarum* and *B. infantis* at different levels: viability of *L. reuteri* was not affected by low pH and bile salts, approximately 4 log units decrease was determined for viability of *L. plantarum* and the viability of *B. infantis* was affected only in the bile salts. In another study, it was reported that *L. casei* strains treated with ultrasound showed better tolerance to acidic conditions and bile salts compared to control (Yeo & Liong, 2013). There are few studies showing the effect of ultrasound application on the viability of microorganisms in acidic conditions and bile salts, but it has been reported that physical processes such as ultrasound application may affect the viability of microorganisms at different levels (Racioppo et al., 2017).

Viability under In vitro Conditions

Enzymes and salts in the gastric and pancreatic environment significantly affect the viability of probiotic microorganisms. Therefore, in order to obtain the desired health benefits from probiotics, their viability in the digestive environment must be at the highest level, and in this regard, viability *in vitro* conditions is one of the most desirable features in the selection of probiotic microorganisms. Viability under *in vitro* conditions of the ultrasound applied and non-applied strains of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were detailed in the Table 1. All strains were showed great viability to gastric conditions and their survivability were more than 92%. Ultrasound application positively affected the viability of the strains to gastric conditions and an increase in the survivability of the strains was observed. Different viability levels were detected for yeast strains to pancreatic conditions. Under pancreatic conditions, the lowest viability rate was observed in the Km strain (71.67%), followed by the Km-5 strain (83.31%). The viability of the other strains under pancreatic conditions was over 94%, and so the application of ultrasound importantly increased the viability of *K. marxianus* under pancreatic conditions. However, the viability of *S. boulardii* and *S. cerevisiae* in pancreatic conditions was not significantly affected by ultrasound application, and slightly decreases or increases were detected depending on the duration of ultrasound application. The overall viability of yeast strains was similar to pancreatic conditions, and the yeast species most affected by ultrasound treatment was *K. marxianus*.

Antibiotic Susceptibility

Antibiotic administration is important, as maintaining the host's microflora balance may cause intestinal disorders. Therefore, antibiotic resistance of probiotics ensures the preservation of healthy intestinal microbiota (Gotcheva et al., 2002). Yeasts are naturally resistant to bacterial antibiotics and can be applied in the treatment of

antibiotic-related diseases. In addition, the resistance of yeasts to fungal antibiotics should be revealed. In this study, resistance to fungal antibiotics was determined for yeast strains that were ultrasound applied and non-applied. All strains were sensitivity against tested antibiotics (Table 1).

The smallest and highest zone diameters against clotrimazole, fluconazole, amphotericin B, ketoconazole and nystatin for ultrasound applied and non-applied strains of *K. marxianus*, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* were measured as follows, respectively: for *K. marxianus*: 9.5-12.5, 18.0-20.0, 7.0-7.5, 22.0-24.0 and 17.0-18.5 mm, for *S. boulardii*, 13.5-16.0, 16.0-20.0, 7.5-7.5, 21.5-22.5 and 16.0-19.0 mm and for *S. cerevisiae*, 17.0-22.0, 21.0-28.0, 7.0-8.0, 22.5-28.0 and 16.5-17.5 mm. Ultrasound application for *K. marxianus* did not have a significant effect on measured zone diameters of antibiotics compared to control ($P>0.05$). However, higher zone diameters were measured for *S. boulardii* strains, which were longer ultrasound applied, against clotrimazole and nystatin, and significant differences were detected compared to control ($P\leq 0.05$). As mentioned above, higher zone diameters were measured for *S. cerevisiae* strains, which were longer ultrasound applied, against only ketoconazole, but for Sc-5 smaller zone diameters were measured against clotrimazole and fluconazole. In a study Bevilacqua et al., (2019), it was reported that ultrasound application significantly affected the minimum inhibition concentration of *A. jensenii* against gentamicin and *P. freudenreichii* against gentamicin and erythromycin, and a lower MIC concentration was measured. However, no significant change was reported against other tested antibiotics. Differences in the measured zone diameters may be related to their different behavior under stress conditions because ultrasound stresses the yeasts, or to their growth in agar medium.

Antioxidant Activity

Antioxidant activity of the yeast cultures was presented in the Figure 5. Antioxidant activity of the yeast cultures changed between 5% and 34% and the highest and lowest values were determined for Sb and Sb-60 strains of *S. boulardii*, respectively.

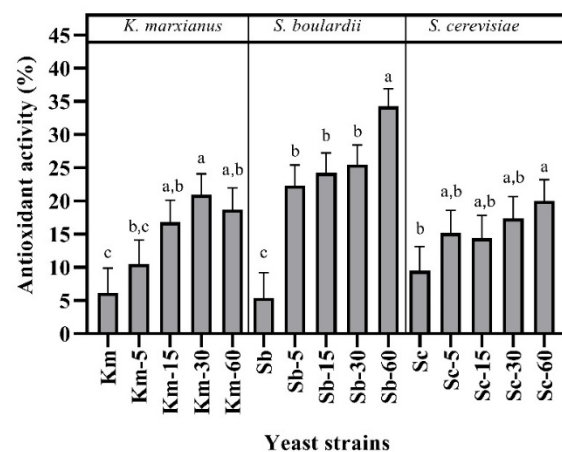


Figure 5. Antioxidant activity profile of ultrasound applied and non-applied yeast strains.

Table 1. pH changes, Survival under *in vitro* conditions and Antibiotic susceptibility of ultrasound applied and non-applied yeast strains.

Yeast Strains	pH Changes During Incubation Period (h)						
	0.	4.	8.	12.	16.	20.	24.
Km	6.22	6.08	6.02	5.92	5.41	4.74	4.48
Km-5	6.20	6.17	6.03	5.94	5.77	5.66	5.56
Km-15	6.22	6.13	5.84	5.55	5.49	5.38	5.33
Km-30	6.27	6.11	5.73	5.48	5.29	5.28	5.25
Km-60	6.31	5.96	5.85	5.54	5.46	5.44	5.30
Sb	6.16	6.04	5.86	5.47	5.42	5.41	5.39
Sb-5	6.24	6.12	5.80	5.44	5.37	5.37	5.35
Sb-15	6.11	6.02	5.76	5.42	5.41	5.33	5.17
Sb-30	6.13	6.02	5.84	5.47	5.44	5.35	5.15
Sb-60	6.14	6.03	5.76	5.45	5.43	5.34	5.21
Sc	6.28	5.93	5.84	5.54	5.50	5.46	5.32
Sc-5	6.28	5.86	5.79	5.61	5.56	5.51	5.26
Sc-15	6.29	5.87	5.80	5.60	5.59	5.41	5.35
Sc-30	6.28	5.91	5.58	5.57	5.56	5.56	5.33
Sc-60	6.02	5.91	5.61	5.59	5.56	5.53	5.47

Yeast Strains	Survival Under <i>in vitro</i> Conditions (%)			Antibiotic susceptibility (mm)				
	Gastric Survival	Pancreatic Survival	Overall Survival	CLT	FLU	AMB	KTC	NY
Km	92.53	71.67	66.32	11.0±1.4 ^{a,b}	18.5±0.7 ^a	7.5±0.7 ^a	24.0±1.4 ^a	18.5±0.7 ^a
Km-5	97.90	82.31	80.58	10.0±1.4 ^{a,b}	19.0±1.4 ^a	7.0±1.4 ^a	24.0±2.8 ^a	17.5±0.7 ^a
Km-15	99.78	96.15	95.95	9.5±0.7 ^b	18.0±1.4 ^a	7.5±0.7 ^a	22.0±1.4 ^a	17.5±2.1 ^a
Km-30	98.24	95.69	94.01	9.5±0.7 ^b	19.0±1.4 ^a	7.5±0.7 ^a	22.0±0.0 ^a	17.0±0.0 ^a
Km-60	99.79	95.41	95.95	12.5±0.7 ^a	20.0±2.8 ^a	7.5±0.7 ^a	23.0±2.8 ^a	18.0±1.4 ^a
Sb	96.44	99.54	95.99	13.5±0.7 ^b	16.0±0.0 ^a	7.5±0.7 ^a	22.5±0.7 ^a	16.0±0.0 ^b
Sb-5	98.22	96.66	94.95	14.5±2.1 ^{a,b}	18.5±0.7 ^a	7.5±0.7 ^a	22.0±2.8 ^a	17.0±0.0 ^{a,b}
Sb-15	97.18	96.73	94.01	16.5±0.7 ^{a,b}	20.0±2.8 ^a	7.5±0.7 ^a	21.5±2.1 ^a	18.0±1.4 ^{a,b}
Sb-30	98.93	96.43	95.40	17.5±2.1 ^a	16.0±0.0 ^a	7.5±0.7 ^a	21.5±0.7 ^a	16.5±0.7 ^b
Sb-60	98.22	96.92	95.19	16.0±0.0 ^{a,b}	16.5±2.1 ^a	7.5±0.7 ^a	21.5±0.7 ^a	19.0±1.4 ^a
Sc	98.87	95.78	94.70	20.0±0.0 ^b	25.5±0.7 ^a	7.5±0.7 ^{a,b}	22.5±0.7 ^b	16.5±0.7 ^a
Sc-5	99.12	94.49	93.66	17.0±0.0 ^c	21.0±1.4 ^b	8.0±0.0 ^a	26.5±2.1 ^a	17.0±1.4 ^a
Sc-15	96.04	95.51	91.72	22.0±0.0 ^a	25.0±0.0 ^a	8.0±0.0 ^a	26.5±0.7 ^a	17.0±1.4 ^a
Sc-30	99.54	96.12	95.68	20.0±1.4 ^b	25.5±0.7 ^a	7.0±0.0 ^b	25.5±0.7 ^a	17.5±0.7 ^a
Sc-60	98.64	95.27	93.98	20.0±1.4 ^b	28.0±2.8 ^a	8.0±0.0 ^a	28.0±0.0 ^a	17.5±0.7 ^a

Km: Ultrasound non-applied *K. marxianus*, Km-5: 5 min. Ultrasound applied *K. marxianus*, Km-15: 15 min. Ultrasound applied *K. marxianus*, Km-30: 30 min. Ultrasound applied *K. marxianus*, Km-60: 60 min. Ultrasound applied *K. marxianus*, Sb: Ultrasound non-applied *S. boulardii*, Sb-5: 5 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-15: 15 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-30: 30 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sb-60: 60 min. Ultrasound applied *S. boulardii*, Sc: Ultrasound non-applied *S. cerevisiae*, Sc-5: 5 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-15: 15 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-30: 30 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*, Sc-60: 60 min. Ultrasound applied *S. cerevisiae*. CLT: Clotrimazole, FLU: Flucanazole, AMB: Amphotericin B, KTC: Ketoconazole, NY: Nystatin. Different letters in the same column show statistical difference ($P \leq 0.05$).

The antioxidant activity values of Km, Sb and Sc strains, which were ultrasound non-applied, were determined as 6%, 5% and 9%, respectively, and *K. marxianus* and *S. cerevisiae* showed higher antioxidant activity than *S. boulardii*. However, ultrasound treatment significantly increased the antioxidant activity of yeast strains and thus the highest antioxidant percentage was determined for *S. boulardii* strain. Antioxidant activities of the ultrasound applied strains were more than 10% and ultrasound treatment increased the antioxidant values of the strains perfectly when compared to the control strains. In addition, increasing of the ultrasound application time resulted higher antioxidant activity of the strains and Sb-60 and Sc-60, which applied ultrasound for the longest time, had the highest antioxidant activity, except Km-60. The increase in antioxidant activities of ultrasound applied strains was found to be significant for all ultrasound applied *S. boulardii* strains ($P \leq 0.05$). However, this increase was found to be significant for *S. cerevisiae* only

in Sb-60, and for *K. marxianus* it was significant for other strains except Km-5 ($P \leq 0.05$).

Antioxidant activity of yeasts is associated with the high amount of β -glucan in their cell walls and some enzymes such as superoxide dismutase, which show antioxidant activity (Goktas et al., 2021b). Changes in antioxidant activity of yeast strains may depend on ultrasound processing parameters (power, frequency and process time) or strain-related parameters (differences in cell wall composition, thickness and size). Additionally, ultrasound applied products may release more bioactive compounds (Gholamhosseinpour & Hashemi, 2019).

Conclusion

Ultrasound application has recently gained importance in many other fields, especially in biotechnology applications in the food industry. In this study, the effects of ultrasound application on probiotic and antioxidant

properties of *K. marxianus* and *S. cerevisiae*, which are important yeast in food fermentation, and *S. boulardii*, which is unique probiotic yeast, were investigated. The findings showed that ultrasound application can be used to improve some probiotic and antioxidant properties of yeast strains. The ultrasound treatment resulted in an increase in the hydrophobicity percentage of yeast cultures, enhanced resistance to in vitro conditions, and an increase in antioxidant properties. However, it is important to reveal the effects of ultrasound at different times and powers in future studies. In addition effect of ultrasound application on fermentation conditions should be investigated, and so can be eliminated the deficiencies in the field of food applications.

Declarations

Author Contributions

Hamza Goktas: Project administration. Demet Turali: Methodology. Cansu Agan: Investigation. Osman Sagdic: Supervision.

Conflict of Interest

The writers inform no conflict of interest.

Acknowledgments

We thanks to Technical Assistant Beyza Kaya.

Funding

This study was financed by TÜBİTAK 2209-A in 2022 with the Application Number 1919B012113124.

Availability of Data

The data that assist the results of this work provides from the corresponding writer upon acceptable demand.

References

- Al Daccache, M., Koubaa, M., Salameh, D., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2020). Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104952. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104952>
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Bevilacqua, A., Racioppo, A., Sinigaglia, M., Speranza, B., Campaniello, D., & Corbo, M. R. (2019). A low-power ultrasound attenuation improves the stability of biofilm and hydrophobicity of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 and *Acidipropionibacterium jensenii* DSM 20535. *Food Microbiology*, 78, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.010>
- Borah, A. J., Agarwal, M., Goyal, A., & Moholkar, V. S. (2019). Physical insights of ultrasound-assisted ethanol production from composite feedstock of invasive weeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.046>
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., . . . Albelo, N. (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*, 108, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.009>
- Gholamhosseinpour, A., & Hashemi, S. M. B. (2019). Ultrasound pretreatment of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus plantarum* AF1: Carbohydrate metabolism and antioxidant activity. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), e12930. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12930>
- Giordano, I., & Mauriello, G. (2023). Ultrasound Attenuation Improves Some Surface Properties of the Probiotic Strain *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393. *Microorganisms*, 11(1), 142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010142>
- Goktas, H., Dertli, E., & Sagdic, O. (2021). Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements. *LWT, Food Science and Technology*, 136, 110340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110340>
- Goktas, H., Dikmen, H., Demirbas, F., Sagdic, O., & Dertli, E. (2021). Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *International Journal of Dairy Technology*, 74(4), 715-722. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12802>
- Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., & Angelov, A. (2002). Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnology*, 16(3), 211-225. <https://doi.org/10.1081/FBT-120016668>
- Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J.-P., & Cocolin, L. (2017). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 62, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.016>
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2018). Salmonella infection—prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*, 164(11), 1327-1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.046>
- Hashemi, S. M. B., & Gholamhosseinpour, A. (2020). Effect of ultrasonication treatment and fermentation by probiotic *Lactobacillus plantarum* strains on goat milk bioactivities. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(6), 2642-2649. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14517>
- Holzappel, W. H. (2006). Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics in food safety and human health*, 10, 1-33.
- Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10. Available from: <http://pc.ilele.hk/public/pdf/20190225/bd3689dfc2fd663bb36def1b672ce0a4.pdf>
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4050-4056. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73546-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8)
- Lanchun, S., Bochu, W., Zhiming, L., Chuanren, D., Chuanyun, D., & Sakanishi, A. (2003). The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S. cerevisiae*s. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2), 43-49. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00023-7)
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 410-417. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.001>

- Racioppo, A., Corbo, M. R., Piccoli, C., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2017). Ultrasound attenuation of lactobacilli and bifidobacteria: Effect on some technological and probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.011>
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., & Khosroushahi, A. Y. (2017a). Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods*, 34, 408-421. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.007>
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., & Khosroushahi, A. Y. (2017b). Secretion metabolites of probiotic yeast, *Pichia kudriavzevii* AS-12, induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 41, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.001>
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022). Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.018>
- Speranza, B., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Corbo, M. R. (2020). Ultrasonic Modulation of the Technological and Functional Properties of Yeast Strains. *Microorganisms*, 8(9), 1399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091399>
- Tomičić, Z. M., Čolović, R. R., Čabarkapa, I. S., Vukmirović, Đ. M., Đuragić, O. M., & Tomičić, R. M. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103-110. <https://doi.org/10.5937/FFR1602103T>
- Unban, K., Chaichana, W., Baipong, S., Abdullahi, A. D., Kanpiengjai, A., Shetty, K., & Khanongnuch, C. (2021). Probiotic and antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented tea leaves (Miang) of north thailand and promising application in synbiotic formulation. *Fermentation*, 7(3), 195. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030195>
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- Yeo, S.-K., & Liang, M.-T. (2013). Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.026>



Investigation of the Antioxidant Potential of Kombucha Prepared Using *Salvia officinalis* L.

Cihan Düşgün^{1,a,*}

¹Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Science, Department of Biology, 51200, Niğde, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 25.07.2024

Accepted : 11.09.2024

Keywords:

Fermentation

Kombucha

S. officinalis

Antioxidant

Fermented beverage

ABSTRACT

Kombucha is a slightly acidic sugary drink made by fermenting sweetened tea. It is known for its numerous health advantages. The objective of this study is to explore the possible effects of *Salvia officinalis* on enhancing the biochemical characteristics of kombucha. The present investigation compared traditional kombucha, produced using green and black tea, with kombucha derived from *S. officinalis*, examining their antioxidant properties, total phenolic, and total flavonoid content. The fermentation process lasted for a duration of 14 days. The present study was performed to evaluate the antioxidant activity of fermented *S. officinalis*. The antioxidant potential was assessed using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and copper (II) reducing antioxidant capacity (CUPRAC) techniques. The DPPH radical reduction percentages were determined to be 93.5±1.65% for kombucha of green tea, 90.6±1.51% for kombucha of black tea, and 88.5±1.68% for kombucha of *S. officinalis*. According to the CUPRAC results, green tea kombucha was found to have 321.58±2.12 mg TE/g, black tea kombucha 305.91±1.98 mg TE/g and *S. officinalis* kombucha 301.97±1.78 mg TE/g. Total phenolic content was 154.15±1.22 mg GAE/g for kombucha of green tea, 145.41±1.31 mg GAE/g for kombucha of black tea, and 124.52±1.25 mg GAE/g for kombucha of *S. officinalis*. The determined value for the total flavonoid content was 101.12±0.98 mg QE/g for kombucha of green tea, 99.41±0.97 mg QE/g for kombucha of black tea, and 92.73±0.78 mg QE/g for kombucha of *S. officinalis*. The findings indicate that *S. officinalis* can serve as a substitute medium for kombucha fermentation, resulting in the development of a novel kind of kombucha with similar chemical characteristics.

^acihandusgun@ohu.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0003-2796-8356>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Fermented products offer various health benefits. These products support intestinal health, strengthen the digestive system and positively affect the immune system. Fermented foods balance intestinal flora and improve overall health because they contain probiotic bacteria. In addition, the fermentation process increases the absorption of nutrients and supports the body's intake of vitamins and minerals. Some fermented products may help prevent cell damage and slow down the aging process thanks to their antioxidant properties (Gülhan, 2023a; Gülhan, 2023b; Gülhan, 2024; Gülhan et al., 2024). Kombucha is a beverage made from fermented tea that has a mildly sparkling, sweet and tangy flavor. It has originated in China, dating back 2000 years. Kombucha is traditionally made by fermenting green or black tea using a combination of acetic acid bacteria, lactic acid bacteria and yeast (Coelho et al., 2020). Kombucha's chemical structure is affected by the quantity of metabolites generated by microorganisms the nature of the substrate employed, and

the fermentation conditions, including duration, temperature, and oxygen levels. A number of organic acids, including acetic, malonic, glucuronic, gluconic, pyruvic, tartaric, citric, L-lactic, oxalic, succinic, usnic, malic and D-saccharic acid-1,4-lactone, have been shown to be present in kombucha, according to studies that appeared in the literature. It also contains tea chemical components such as polyphenols (theaflavins, catechins, and flavonoids), vitamins (C, E, K, B1, B2, B3, B6 and B12), minerals (Fe, Cu, Ni, Zn and Mn), proteins and amino acids (Coelho et al., 2020; de Miranda et al., 2022; Tu et al., 2024). Kombucha beverage has been proposed to offer numerous health advantages because of its anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antidiabetic, and antihypercholesterolemic properties. Furthermore, kombucha has been shown to possess liver-protective, brain-protective, and gastrointestinal therapeutic properties (Anantachoke et al., 2023; Diez-Ozaeta & Astiazaran, 2022; Mousavi et al., 2020).

Despite the fact that black and green tea are considered to be primary materials utilized in the manufacture of kombucha, there are several studies that have been conducted in which other raw materials have been utilized as alternative substrates. In recent studies, grape pomace (Barakat et al., 2024), corncob (Liu et al., 2024), soy whey (Feng et al., 2024) and *Sargassum fusiforme* (Harv.) (Tu et al., 2024) were used to produce kombucha by using different substrates. The findings indicate that kombucha made from alternate substrates exhibits superior advantages, chemical composition, and biological features compared to traditional kombucha.

Salvia officinalis, often known as Sage, is a member of the Lamiaceae family. Originally indigenous to the Middle East and Mediterranean areas, this plant has now become established in several parts of the world. *S. officinalis* has been utilized in traditional medicine to address various conditions including ulcers, rheumatism, gout, inflammation, tremors, diarrhea, paralysis and hyperglycemia. Over the past few years, there has been a significant focus on conducting thorough investigations on this plant to record its traditional usage and discover novel biological impacts. Studies have uncovered a diverse array of pharmacological actions associated with *S. officinalis*. The pharmacological findings that have been reported include the following effects: anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, antibacterial, antimutagenic, hypoglycemic, antedementia and hypolipidemic (Ghorbani & Esmaeilzadeh, 2017).

This study examined the feasibility of integrating *S. officinalis* into kombucha to develop a novel beverage and enhance its chemical characteristics. This research compared normal kombucha, derived from green and black tea, with kombucha prepared by *S. officinalis*.

Materials and Methods

Kombucha Fermentation

To prepare kombucha, green and black tea leaves and *S. officinalis* leaves were provided in dry form. Plant samples were purchased from a local market in Niğde, Turkey. 70 g of sucrose was dissolved in 1 L of water and heated to the boiling point. After the heat was turned off, 7 g of dried plant materials were added and infused for 30 minutes. Then, the tea leaves were filtered and allowed to reach room temperature. 10% of the previous culture was inoculated into the infusion that reached room temperature and was left to ferment at 25±1°C. The same ratios and procedures were applied for green, black tea and *S. officinalis* (Jayabalan et al., 2008).

pH Determination

pH measurement was carried out with a pH meter (WTW series Multi 9620 IDS, Weilheim, Germany) in 3 repetitions before and at the end of fermentation.

Determination of DPPH Radical Scavenging Activity

The solutions' capacity to remove free radicals was assessed by measuring their free radical scavenging capabilities using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. The method proposed by Brand-Williams et al. (1995), was implemented with necessary modifications. Kombucha samples were filtered through a 0.22 microliter

syringe filter to remove microorganisms. The supernatant was used after filtration. 20 µL of kombucha sample was put into the sample tubes, and 180 µL of 1mM DPPH was added onto it and incubated for 30 minutes in a light-proof place at room temperature. Experiments were performed in three parallels. Following incubation, absorbance was measured at 517 nm, using methanol as the reference solution. The decrease in absorbance indicated the remaining quantity of DPPH solution, which represents the activity of scavenging free radicals. The calculation of the DPPH radical scavenging activity percentage was performed using the following equation:

$$\text{Radical scavenging power (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

where A_0 is the absorbance of the control and A_1 is the absorbance of the extract sample/standard at 30 min. The analysis of all the samples was done in triplicate.

Copper (II) Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC)

For this study, 500 µL of Copper (II) Chloride (CuCl_2) solution and 500 µL of Ammonium Acetate (pH= 7.0, 1 M) solution were placed in 2.5 mL centrifuge tubes. 500 µL of Neocuproin ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$) (7.5×10^{-3} M) solution was added to each tube. A volume of 100 µL of kombucha sample, with a concentration of 1 mg/mL, was added to the tubes and then diluted with distilled water to a final volume of 2 mL. In the case of empty samples, distilled water was used as a substitute for the extract. The specimen was subjected to incubation at both room temperature and in a water bath set at 50°C for a duration of 30 minutes. The measurement of absorbance at a wavelength of 450 nm was taken using the blank sample as a reference (Selamoglu et al., 2017).

Analysis of Total Phenolic Content

The total phenol content was determined using the Folin–Ciocalteu reagent, following the method described by Düşgün et al. (2021). The Folin–Ciocalteu method relies on the generation of blue-hued molecules by the transfer of electrons from phenolic compounds to phosphomolybdic and phosphotungstic acids in an alkaline setting. These compounds are read spectrophotometrically at an average of 760 nm. 0.1 mL of the prepared kombucha samples was taken and added to 1 mL of Folin–Ciocalteu solution (diluted 10 times) and incubated for 5 minutes. 1 mL of 7.5% sodium bicarbonate solution was added. After 90 minutes of incubation, the absorbance of the samples was read at 765 nm. The outcomes were determined by applying gallic acid standards to the calculations (İldiz et al., 2022).

Analysis of Total Flavonoid Content

The total flavonoid content was determined as previously reported spectrophotometric method with minor modification (Zeynali et al., 2023). In summary, a 1 mL sample of kombucha was combined with an equal volume of AlCl_3 (2%) in methanol. In the same way, a blank was created by combining 1 mL of sample solution with 1 mL of methanol, excluding AlCl_3 . Following a 10-minute period of incubation at ambient temperature, the absorbances of both the sample and the blank were

measured at a wavelength of 415 nm. The blank absorbance was subtracted from the sample. Quercetin was used as a reference standard, and total flavonoid content was expressed as milligram quercetin equivalents (mg QE/g extract).

Statistical analysis

The study reported the findings of multiple analyses using the mean \pm standard deviation format. The ANOVA was used to assess the means of the experimental results, and significance tests were conducted using Duncan's multiple range tests for statistical significance ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Color analysis

This study examined the kombucha fermentation process on 3 substrates over a 14-day period. During the processes, *S. officinalis* kombucha as well as traditionally produced green and black tea kombucha were included. It was observed that the dark color turned into light during the fermentation period. In addition, the sour odor grew as the fermentation process progressed and a bacterial cellulose layer formed. The first three days of fermentation observed bacterial cellulose production on Kombucha's surface, which thickened as fermentation progressed. The fermentation conditions and yeast-acetic acid bacteria synergy increased cellulose yield (Tapias et al., 2022; Tapias et al., 2023). The difference of color change indicated that the fermentation process was carried out successfully. The similar indications were reported in other studies (Pure & Pure, 2016; Zou et al., 2021). Carbon is essential for the growth and metabolic processes of nearly all living microorganisms. Furthermore, it is a fundamental component of every substance that makes up protoplasm. The bacterial cellulose 'mother' (starter) culture requires a carbon source, primarily sucrose, as it cannot produce sufficient cellulose independently. Previously, (Gülhan, 2023c) have produced cellulose by kombucha fermentation using different carbon sources. In the present study, results of experiments conducted revealed that the using different carbon source present in the tea broth affects the synthesis of bacterial cellulose, and these findings are similar to the previous report by (Gülhan, 2023c). Therefore, the cellulose layer production can be attributed to use different carbon source including *S. officinalis*.

Biological Activity Results

The pH values of green, black tea kombucha and *S. officinalis* kombucha at 25°C and on the 0th and 14th days of fermentation are given in Table 1. There was a decrease in pH levels in all infusion groups due to the increase in fermentation time ($p < 0.05$). The reduction in pH levels in kombucha samples during fermentation is mostly attributed to the rise in organic acid concentration. The findings of Dusgun (2024), Kaewkod et al. (2019) and Velićanski et al. (2014) were similar with this study's data. The concentration of hydrogen ions in the surrounding environment is a key factor that can either promote or inhibit the growth of certain microorganisms in food. Bacteria that produce acetic acid can survive in media with pH levels ranging from 3.5 to 6.4. However, these bacteria thrive best when the pH is at least 5.4. The pH value of *S.*

officinalis kombucha was 6.44 ± 0.21 and 3.68 ± 0.29 in before and end of the fermentation, respectively. Throughout the fermentation process, from day 0 to day 14, all groups experienced a decline in pH levels as a result of increased organic acid production. However, this value caused a slight increase in the values of black tea kombucha compared to the beginning on the 14th day of fermentation (Table 1). In previous research, it was discovered some molecules generated as a result of microbial activities can cause pH fluctuations by exhibiting a buffering effect, contingent upon the liquid concentration in the fermentation medium (Bressani et al., 2024; Ziemlewska et al., 2023). This gradual reduction in pH was attributed to the buffering capabilities inherent in the kombucha solutions. Bressani et al. (2024) reported that the pH of kombucha prepared using yam dropped rapidly within the first 5 days of fermentation, then dropped further by the 14th day. In another study, kombucha samples made from various teas (white, green, black, and red) initially had pH levels ranging from 5.34 to 6.53. The researchers observed that after 14 days of fermentation, the pH dropped significantly, reaching values between 2.32 and 2.53.

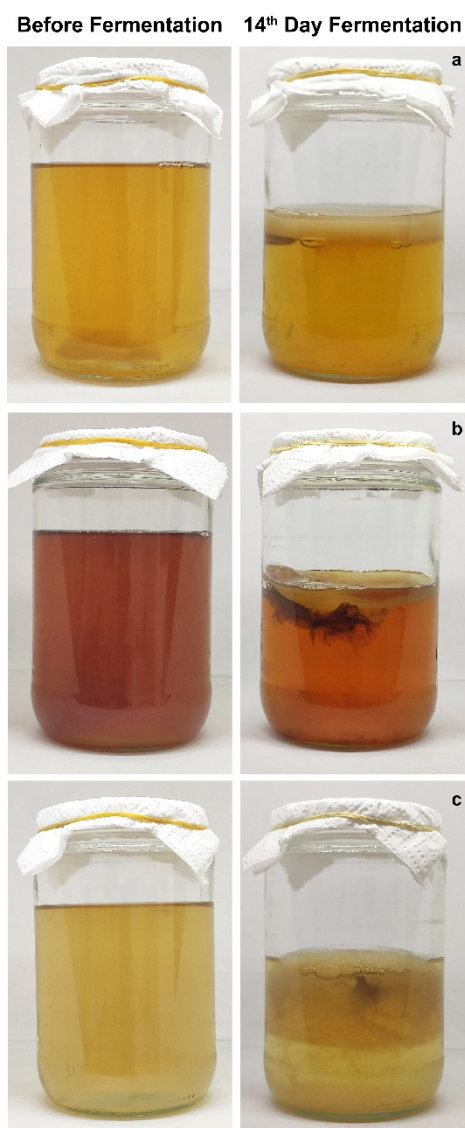


Figure 1 Kombucha fermentation for 14th day (a: Green tea kombucha, b: Black tea kombucha, c: *S. officinalis* kombucha)

Table 1. Kombucha analyzes and results

Analyses	Initial pH	Final pH	Total phenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)	DPPH (%)	CUPRAC (mg TE/g)
Green tea kombucha	6.58±0.19 ^a	3.65±0.26 ^a	154.15±1.22 ^a	101.12±0.98 ^a	93.5±1.65 ^a	321.58±2.12 ^a
Black tea kombucha	6.67±0.27 ^a	3.51±0.23 ^a	145.41±1.31 ^a	99.41±0.97 ^a	90.6±1.51 ^a	305.91±1.98 ^b
<i>S. officinalis</i> kombucha	6.44±0.21 ^a	3.68±0.29 ^a	124.52±1.25 ^b	92.73±0.78 ^b	88.5±1.68 ^b	301.97±1.78 ^c

*The values shown are the average (mean) values with the standard deviation (S.D.) calculated from three separate measurements conducted in parallel. Distinct letters in the same column indicate statistically significant differences between the examined samples ($p < 0.05$).

The research found that on the 14th day, pH levels ranged from 3.51 to 3.68, which falls within the acceptable acidity range for drinkable beverages. However, it's important to note that consuming drinks with extremely low pH levels may negatively impact the digestive system. Therefore, when it comes to kombucha, both the duration of fermentation and the quantity consumed are equally significant factors to consider.

Total phenolic substance content is shown in Table 1. The highest total phenolic substance content was observed in kombucha prepared with green tea (154.15±1.22 mg GAE/g). In addition, 145.41±1.31 mg GAE/g was found in black tea kombucha, while 124.52±1.25 mg GAE/g was found in kombucha prepared with *S. officinalis*. Total phenolic substance content was determined in all samples as a result of kombucha fermentation.

Total flavonoid substance content results are shown in Table 1. According to the results, green tea showed the highest flavonoid substance content with 101.12±0.98 mg QE/g, while kombucha prepared with black tea was found to be 99.41±0.97 mg QE/g. In kombucha prepared with *S. officinalis*, 92.73±0.78 mg QE/g total flavonoid substance content was determined.

There were similar patterns observed in the relationship between the overall amount of phenolic compounds and flavonoid compounds, with the highest levels occurring after 14 days of fermentation. On the 14th day of fermentation, the total phenolic and flavonoid substance content of kombucha containing *S. officinalis* increased slightly, while traditional kombucha remained consistent during the whole fermentation process. Zhang et al. (2020) produced kombucha from rose and jujube kernel. Additionally, it was discovered that the overall quantity of phenolic minerals reached its highest point three days after the commencement of fermentation, then declined, and then stayed stable until the 10th day of fermentation (Zhang et al., 2020).

The results of the DPPH antioxidant activity test were found to be at the highest level with 93.5±1.65% for green tea kombucha, while it was found to be 90.6±1.51% for black tea kombucha, as shown in Table 1. In *S. officinalis* kombucha, it was measured as 88.5±1.68%. It was determined that it showed antioxidant properties as a result of the fermentation process.

Following the DPPH test results, the Copper reduction test results are shown in table 1. As a consequence of the findings, green tea kombucha was found to be 321.58±2.12 mg TE/g, while black tea kombucha was found to be 305.91±1.98 mg TE/g. *S. officinalis* kombucha was found to be as effective as traditionally prepared green tea and black kombucha, with a very high level of 301.97±1.78 mg TE/g.

The amount of total phenolic and flavonoid content in kombucha made from *S. officinalis* was comparable to that

of typical kombucha made from green and black tea. The quantity of total phenolic and flavonoid content that was discovered to be present in kombucha that was made with green tea was the greatest. Additionally, high phenolic content levels were determined in kombucha samples prepared with black tea kombucha and *S. officinalis* kombucha. Because *S. officinalis* is a rich source of polyphenols and other bioactive compounds (Belcadi et al., 2023), the rise in total phenolic and flavonoid content may be attributed to the fact that green and black tea are similarly high in polyphenols but poor in vitamins, organic acids, and minerals (Khaleil et al., 2020; Zhou et al., 2022). A number of studies have shown that the fermentation process has the potential to raise both total phenolic and flavonoid content. Additionally, the mixing of alternate substrates has the potential to raise total phenolic and flavonoid content in comparison to traditional kombucha. For example, Khaleil et al. (2020) *Psidium guajava* L. examined the fermentation of kombucha with (hibiscus) and found that the total phenolic content of this sample increased after fermentation. In a separate study conducted by Xiong et al. (2023), kombucha was made from bamboo leaf. It was shown that the levels of total phenolic and flavonoid content increased following the fermenting process (Zubaidah et al., 2018). In accordance with Pure & Pure (2016), the polyphenols that can be found in things like fruits, vegetables, and tea leaves undergo degradation during the kombucha fermentation process, leading to an increase in total phenolic and flavonoid content. Polyphenols are bioactive substances characterized by many phenol chemicals within every molecule. In the fermentation process of kombucha, bacteria secrete an enzyme that breaks down polyphenols into smaller molecules, hence leading to an increase in total phenolic and flavonoid content (Xiong et al., 2023; Zubaidah et al., 2018).

In addition, this investigation revealed a correlation between the antioxidant activity, as observed by the DPPH test and CUPRAC test, and the total phenolic content. The rise in antioxidant activity can be attributed to the augmentation of chemical components, including ascorbic acid, phenolic substances, flavonoids and other organic acids, that are generated fermentation process (Ojo & de Smidt, 2023). In this investigation was revealed that the antioxidant activity of kombucha was notably higher when *S. officinalis* were dried prior to the preparation procedure, in comparison to other methods. Multiple studies have demonstrated that *S. officinalis* exhibits antioxidant properties as a result of its content of polyphenolic chemicals and flavonoids. Furthermore, the antioxidant capabilities differ according on the specific forms and extraction methods employed. Ben Akacha et al. (2023) reported that dried *S. officinalis* exhibited a 96% reduction in the activity of scavenging free radicals, surpassing the

57% inhibition observed in fresh plant leaves. According to the study by Belcadi et al. (2023), they determined antioxidant properties in extracts of the *S. officinalis* plant prepared using various solvents. In addition, in their study using the CUPRAC method, they revealed that *S. officinalis* extracts have antioxidant properties resulting from the bioactive compounds contained in them (Zeynali et al., 2023).

The total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and organic acid content of kombucha are all affected by a variety of factors, including microorganisms the kind of substrate, the fermentation duration, temperature, and pH (Jayabalan et al., 2008; Khaleil et al., 2020). For this reason, it is essential to do more research on a pilot scale and determine the optimal ratio of dried *S. officinalis* in order to enhance the chemical composition of kombucha products.

Conclusion

Sage, also known as *Salvia officinalis*, has the ability to improve the fermentation process of traditional kombucha. This research marks the first attempt to create kombucha using *S. officinalis*. The study aimed to evaluate the potential of *S. officinalis* as a substitute for the traditional black and green tea substrates in kombucha production. To assess its viability, the researchers compared the physicochemical attributes, total phenolic and flavonoid content, and antioxidant properties of kombucha made with *S. officinalis* against those made with green and black tea. As a result of the analyses made on kombucha prepared using *S. officinalis*, high total phenolic, total flavonoid substance and high antioxidant activity were observed in samples taken on the 14th day of fermentation, similar to traditional kombucha prepared with green and black. This research supported the concept of creating a functional beverage by utilizing medicinal plants with tea properties to produce kombucha. The newly developed functional beverage products demonstrated high compatibility and exhibited enhanced bioactive properties and health advantages compared to traditional kombucha tea, showing promise for industrial production. Further in vivo studies are necessary to validate the health effects of kombucha made with *S. officinalis* on humans.

Declarations

Conflict of Interest

The author declares no conflict of interest.

Fund Statement

There is no financial support.

Data Availability

All the data generated or analyzed during this study are included in this published article.

References

- Anantachoke, N., Duangrat, R., Sutthiphakul, T., Ochaikul, D., & Mangmool, S. (2023). Kombucha Beverages Produced from Fruits, Vegetables, and Plants: A Review on Their Pharmacological Activities and Health Benefits. *Foods*, 12(9), 1818. <https://doi.org/10.3390/foods12091818>
- Barakat, N., Bouajila, J., Beaufort, S., Rizk, Z., Taillandier, P., & El Rayess, Y. (2024). Development of a new kombucha from grape pomace: The impact of fermentation conditions on composition and biological activities. *Beverages*, 10(2), 29-45. <https://doi.org/10.3390/beverages10020029>
- Belcadi, H., Chraka, A., El Amrani, S., Raissouni, I., Moukhles, A., Zantar, S., Toukour, L., & Mansour, A. I. (2023). Investigation and valorization of the moroccan *Salvia officinalis* L. essential oil: phytochemistry, potential in corrosion inhibition, antibacterial activity, and theoretical modeling. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion*, 9(3), 50. <https://doi.org/10.1007/s40735-023-00769-2>
- Ben Akacha, B., Ben Hsouna, A., Generalić Mekinić, I., Ben Belgacem, A., Ben Saad, R., Mnif, W., Kačaniová, M., & Garzoli, S. (2023). *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* essential oils: Chemical composition, biological activities and preservative effects against *Listeria monocytogenes* inoculated into minced beef meat. *Plants*, 12(19-31), 3385-3409. <https://doi.org/10.3390/plants12193385>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bressani, A. P. P., Casimiro, L. K. S., Martinez, S. J., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2024). Kombucha with yam: Comprehensive biochemical, microbiological, and sensory characteristics. *Food Research International*, 192(2024), 114762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114762>
- Coelho, R. M. D., de Almeida, A. L., do Amaral, R. Q. G., da Mota, R. N., & de Sousa, P. H. M. (2020). Kombucha. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- de Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87(2), 503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Diez-Ozaeta, I., & Astiazaran, O. J. (2022). Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109783. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>
- Duşgun, C. (2024). An investigation of the impact of fermentation conditions and total acid contents on the kombucha tea. *Biotechnology Journal International*, 28(5), 1-7. <https://doi.org/10.9734/bji/2024/v28i5735>
- Düşgün, C., Kankılıç, T., İşlek, C., Balı, D. F., & Kankılıç, Ö. (2021). Antioxidant and cytotoxic potential of local endemic plant *Pastinaca zozimoides* Fenzl. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(4), 646-649. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i4.646-649.3715>
- Feng, X., Ge, Z., Wang, Y., Xia, X., Zhao, B., & Dong, M. (2024). Production and characterization of bacterial cellulose from kombucha-fermented soy whey. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6(1), 20-34. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00188-3>
- Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2016.12.014>
- Gülhan, A. (2023a). Physicochemical, microbiological and sensory analyses of functional detox juices fermented with water kefir grains. *Gıda*, 48(4), 715-727. <https://doi.org/10.15237/gida.GD23039>
- Gülhan, A. (2023b). Usability of carbon sources as sucrose, honey and agave syrup in fermentation of lemonade with water kefir grains. *Sugar Tech*, 25(6), 1542-1556. <https://doi.org/10.1007/s12355-023-01301-z>

- Gülhan, A. (2024). Use of ice teas formulated with black teas prepared with different infusion methods and grape juice in the production of water kefir beverages. *Food and Humanity*, 2, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.100219>
- Gülhan, M. F. (2023c). A new substrate and nitrogen source for traditional kombucha beverage: *Stevia rebaudiana* leaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(7), 4096-4115.
- Gülhan, M. F., Gülhan, A., & Düşgün, C. (2024). Physico-chemical and microbiological properties of water kefir produced from carob (*Ceratonia siliqua* L.) sherbet. *Food Science and Biotechnology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01682-1>
- Ildız, E., Canpolat, Ş., İşlek, C., Canpolat, E. Y., İşlek, Y., & Akata, I. (2022). *Bjerkandera adusta* collected from niğde: analysis of total phenolic compound, antioxidant, and antimicrobial properties. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10, 2996-3000. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10isp2.2996-3000.5750>
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., & Yun, S. E. (2008). Preservation of kombucha tea effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9064-9071. <https://doi.org/10.1021/jf8020893>
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*, 7(12), 700. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700>
- Khaleil, M. M., Abd Ellatif, S., Soliman, M. H., Abd Elrazik, E. S., & Fadel, M. S. (2020). A bioprocess development study of polyphenol profile, antioxidant and antimicrobial activities of kombucha enriched with *Psidium guajava* L. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1204-1210. <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/4505>
- Liu, Z., Sun, Q., Wang, Y., Liu, J., & Zhu, P. (2024). Preparation and characterization of bacterial cellulose by kombucha using corncob. *Cellulose*, 1, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10570-024-06018-0>
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S., & Mazraedoost, S. (2020). Recent progress in chemical composition, production, and pharmaceutical effects of kombucha beverage: A complementary and alternative medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/4397543>
- Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Microbial composition, bioactive compounds, potential benefits and risks associated with kombucha: A concise review. *Fermentation*, 9(5), 472-482. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>
- Pure, A. E., & Pure, M. E. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*, 3(2), 125-130. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11138>
- Selamoglu, Z., Düşgün, C., Akgül, H., & Gülhan, M. F. (2017). In-vitro antioxidant activities of the ethanolic extracts of some contained-allantoin plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(Suppl), 92-98. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2017.1993>
- Tapias, Y. A. R., Di Monte, M. V., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2022). Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. *Food Chemistry*, 372, 131346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>
- Tapias, Y. A. R., Di Monte, M. V., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2023). Kombucha fermentation in yerba mate: Cellulose production, films formulation and its characterisation. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 100310. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100310>
- Tu, C., Yu, T., Feng, S., Xu, N., Massawe, A., Shui, S., & Zhang, B. (2024). Dynamics of microbial communities, flavor, and physicochemical properties of kombucha-fermented *Sargassum fusiforme* beverage during fermentation. *LWT*, 192, 115729. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115729>
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas Šaponjac, V. T., & Vulić, J. J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 420-429. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3611>
- Xiong, R.-G., Wu, S.-X., Cheng, J., Saimaiti, A., Liu, Q., Shang, A., Zhou, D.-D., Huang, S.-Y., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2023). Antioxidant activities, phenolic compounds, and sensory acceptability of Kombucha-Fermented beverages from bamboo leaf and mulberry leaf. *Antioxidants*, 12(8), 1573-1581. <https://doi.org/10.3390/antiox12081573>
- Zeynali, R., Najafian, S., & HosseiniFarahi, M. (2023). Exogenous putrescine changes biochemical (antioxidant activity, polyphenol, flavonoid, and total phenol compounds) and essential oil constituents of *Salvia officinalis* L. *Chemistry & Biodiversity*, 20(11), e202301043. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301043>
- Zhang, S., Cheng, M., Li, Z., Guan, S., Cai, B., Li, Q., & Rong, S. (2020). Composition and biological activity of rose and jujube kernel after fermentation with kombucha SCOBY. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), 1-11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14758>
- Zhou, D. D., Saimaiti, A., Luo, M., Huang, S. Y., Xiong, R. G., Shang, A., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2022). Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. *Antioxidants*, 11(1), 155-171. <https://doi.org/10.3390/antiox11010155>
- Ziemlewska, A., Zagórska-Dziok, M., Nizioł-Lukaszewska, Z., Kielar, P., Mołoń, M., Szczepanek, D., Sowa, I., & Wójciak, M. (2023). *In vitro* evaluation of antioxidant and protective potential of kombucha-fermented black berry extracts against H₂O₂-induced oxidative stress in human skin cells and yeast model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4388. <https://doi.org/10.3390/ijms24054388>
- Zou, C., Li, R. Y., Chen, J. X., Wang, F., Gao, Y., Fu, Y. Q., Xu, Y. Q., & Yin, J. F. (2021). Zijuan tea-based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *Food Chemistry*, 363, 130322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130322>
- Zubaidah, E., Dewantari, F. J., Novitasari, F. R., Srianta, I., & Blanc, P. J. (2018). Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.012>



Changes in Phenolic, Flavonoid and Antioxidant Capacity of Gluten-Free Crackers Enriched with Pomegranate Seeds During *In Vitro* Gastrointestinal Digestion

Zehra Gülsünoğlu Konuşkan^{1,a,*}, Büşra Göz^{1,b}

¹*İstanbul Aydın Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 34295, İstanbul, Türkiye*

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 31.07.2024

Accepted : 12.09.2024

Keywords:

Gluten-free

Cracker

Green lentil

Pomegranate seed

Gastrointestinal digestion

ABSTRACT

In this study, the use of pomegranate seed powder in the production of novel, functional and gluten-free crackers was investigated in order to eliminate nutritional gaps and meet the demand for healthier gluten-free options. For this reason, the chemical composition and physical and sensory properties of gluten-free crackers prepared with green lentil flour enriched with pomegranate seed powder were evaluated. In addition, *In vitro* gastrointestinal digestion model was used to evaluate the changes in total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) content and total antioxidant activity (TAA) of gluten-free crackers before and after digestion. Based on the findings, the addition of pomegranate seed powder did not cause any significant change in the chemical, physical and sensory properties of crackers. An increase was observed in the TPC, TFC and TAA of crackers with the addition of pomegranate seed powder. Furthermore, after *In vitro* gastrointestinal digestion, crackers enriched with pomegranate seed powder were found to have 290%, 192% and 159-204% more bioaccessible TPC, TFC and TAA compared to undigested crackers, respectively. As a result, it seems that gluten-free crackers with green lentil flour enriched with pomegranate seed powder have good potential in terms of both consumer appeal and imparting health benefits.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2298-2305, 2024

Nar Çekirdeği İlaveli Glütensiz Krakerlerin *In Vitro* Gastrointestinal Sindirim Sırasında Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan Kapasitesinde Meydana Gelen Değişimler

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 31.07.2024

Kabul : 12.09.2024

Anahtar Kelimeler:

Glütensiz

Kraker

Yeşil mercimek

Nar çekirdeği

Gastrointestinal sindirim

ÖZ

Bu çalışmada, nar çekirdeği tozunun yeni, fonksiyonel ve glütensiz bir kraker üretiminde kullanılmasının yanı sıra, besin ögesi açığını gidermek ve daha sağlıklı glütensiz seçeneklere yönelik talebi karşılamak amacıyla kullanım olanakları da araştırılmıştır. Bu sebeple, nar çekirdeği tozu ile zenginleştirilmiş yeşil mercimek unuyla hazırlanan glütensiz krakerlerin kimyasal kompozisyonu, fiziksel ve duyuşal özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, glütensiz krakerlerin sindirim öncesi ve sonrası toplam fenolik (TPC) ve flavonoid madde (TFC) içeriğinde ve toplam antioksidan aktivitesinde (TAA) meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için *In vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar nar çekirdeği tozu ilavesinin krakerlerin kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerinde anlamlı bir değişime sebep olmadığını göstermiştir ($P>0,05$). Nar çekirdeği tozu ilavesi ile krakerlerin TPC, TFC ve TAA miktarında artış görülmüştür. İlavenin, *In vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında nar çekirdeği tozu ilaveli krakerlerin sindirilmemiş krakerlere oranla sırasıyla %290, %192 ve %159-204 kadar daha fazla biyoerişilebilir TPC, TFC ve TAA'ya sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, nar çekirdeği ile zenginleştirilmiş yeşil mercimek unlu glütensiz krakerlerin hem tüketici ilgisini çekmesi açısından hem de sağlık faydaları açısından iyi bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

^a zehragulsunoglu@aydin.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0001-6497-1912>

^b busragoz@aydin.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-2371-9603>



Giriş

Nar (*Punica granatum* L.) içinde küçük çekirdekleri olan ve meyve gövdesinde bulunan yüzlerce tanecikten oluşmuş, tadı hafif ekşi veya tatlı bir meyvedir. Taze olarak tüketilebildiği gibi, endüstriyel olarak nar ekşisi, nar suyu, nar pekmezi, nar sirkesi gibi ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Tanenler, flavanoidler gibi fenolik bileşenler ile folat, C vitamini, fosfor, demir, potasyum ve lif gibi mikro ve makro besin öğeleri açısından zengin bir meyve olması sebebiyle narın sağlık üzerine olumlu etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Sönmezdağ, 2021; Viuda-Martos ve ark., 2010; Vučić ve ark., 2019). Nar meyvesinin yaklaşık %78'i kabuk kısmından oluşmaktayken çekirdek kısmı ise %22'lik kısmını oluşturmaktadır (Abid ve ark., 2017). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ne göre dünyada yıllık 1,5 milyon ton yüksek besin değerine sahip endüstriyel nar atığı oluşmaktadır (Gholipour ve ark., 2023). Bu atıkların yüksek besin içeriği sebebiyle geri dönüşümünün sağlanması ve katma değer yaratılarak ekonomiye kazandırılması önemlidir.

Kraker, her yaşta insanın keyifle tükettiği popüler bir atıştırma olarak yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Başlıca buğday unu, su, maya veya kabartıcılar, yağ ve şeker içeren krakerlerin çoğu besin değeri ve işlevsellik açısından yetersiz kalmaktadır. Atıştırma ürünlerinin daha besleyici olmalarına yönelik artan tüketici talebi, araştırmacıları besin değeri açısından yetersiz kabul edilen ürünlerin protein, lif, vitamin ve mineral ile zenginleştirilmesi konusuna yöneltmiştir (Tomić ve ark., 2024). Ayrıca, bazı kronik hastalık risklerini azaltma potansiyelleri nedeniyle zenginleştirme amacıyla kullanılan bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin de yüksek olması tercih edilmektedir. Literatürde araştırmacılar, kuş iğdesi (Incedayı & Turkmen Erol, 2023), çimlendirilmiş mercimek ekstraktı (Polat ve ark., 2020), ananas kabuğu (Mala ve ark., 2024), nar kabuğu (Urgancı & Fatma, 2021), mango kabuğu (Ashoush & Gadallah, 2011) ve muz kabuğu (Zoair ve ark., 2019) gibi meyve ve meyve atığı tozlarını besin kalitesini arttırmak, sağlık yararları sağlamak ve maliyeti düşürmek için fırıncılık ürünlerinin formülasyonlarına ilave etmişlerdir. Ancak, literatürde nar çekirdeğinin kraker üretiminde kullanımını konusunda araştırmaya rastlanmamıştır.

Glütensiz fırıncılık ürünleri giderek artan bir pazar payına sahip olsalar da pirinç ve mısır unu gibi karbonhidrat açısından zengin hammaddelerden yapıldıkları için genellikle yeterli besin değerinden yoksundurlar (Tomić ve ark., 2024). Bu durum, araştırmacıları baklagilleri kullanmaya ve bu ürünleri daha sağlıklı glütensiz seçenekler üretmek için gıda atıklarıyla zenginleştirmeye yöneltmiştir. Bu çalışmanın amacı, nar çekirdeği ile zenginleştirilmiş yeşil mercimekli fonksiyonel glütensiz kraker üretmek ve bu krakerlerin kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özelliklerini belirlemek; aynı zamanda, sindirim sürecinden kaynaklanan glütensiz krakerlerin toplam fenolik madde (TPC), flavanoid madde (TFC) ve toplam antioksidan aktivitelerindeki (TAA) değişikliklerin incelenmesidir. Bu çalışmada ek olarak, sindirim süreci hakkında daha kapsamlı bir bilgi elde edebilmek için biyoerişilebilirlik değerleri hesaplanarak

hem *In vitro* sindirimden önce hem de sonra bu değişikliklerin incelenmesi de amaçlanmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan doğal sızma zeytinyağı, toz şeker, tuz, badem sütü, tarçın, muz ve yeşil mercimek İstanbul'da bulunan yerel marketlerden temin edilmiştir. Nar çekirdekleri ise TARGID firmasında (Mersin, Türkiye) üretilen konsantre ve berrak nar suyu üretim prosesi atıklarından toplanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Yeşil Mercimek Unu Üretimi

Yeşil mercimekler 1:3 (w/v) oranında olacak şekilde su içinde 12 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve belirtilen süre sonunda süzülerek mutfak tipi fırında 100°C'de 25 dakika boyunca kurutulmuştur. Kuruyan yeşil mercimekler laboratuvar tipi paslanmaz çelik öğütücüde (IKA, Wilmington, North Carolina, ABD) öğütülerek un haline getirilmiştir. Elde edilen yeşil mercimek unu glütensiz kraker formülasyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır.

Nar Çekirdeklerinin Hazırlanması

Nar çekirdekleri -20°C'de dondurulmuş ve 24 saat süre ile 0.001 mBar basınç altında -55°C'de liyofilizatör (Teknosem, İstanbul, Türkiye) kullanılarak kurutulmuştur. Kurutulan nar çekirdekleri, paslanmaz çelik öğütücü ile toz haline getirilmiş ve glütensiz kraker formülasyonunda kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır.

Glütensiz Krakerlerin Üretimi

Glütensiz kraker formülasyonları literatürde benzer bir çalışma dikkate alınarak hazırlanmıştır (Toğrul, 2021). Çizelge 1'de formülasyonları verilen kraker hamurları yoğurma işleminin ardından, boyutları 0,5x9x1 cm olacak şekilde şekillendirilmiş ve önceden ısıtılmış fırında 180°C'de 20 dakika boyunca pişirilmiştir. Fırından çıkarılan krakerler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve sonraki analizler için -20°C'de depolanmıştır.

Kimyasal Analizler

Hazırlanan glütensiz krakerlerin kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla nem, kül, toplam protein ve toplam yağ analizi yapılmıştır. Toplam karbonhidrat miktarı ise kuru ağırlıktan protein, yağ ve kül miktarı çıkarılarak hesaplanmıştır. Tüm kimyasal analiz sonuçları kuru madde (km) cinsinden % olarak verilmiştir. Nem ve kül miktarı Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC) metoduna göre gravimetrik olarak belirlenmiştir (AOAC, 2000). Örneklerin yağ miktarı ise Soxhlet cihazı kullanılarak belirlenmiştir (AOAC, 2000). Yağ analizi öncesi örneklerin nemi uzaklaştırılmış, 3 g örnek tartılarak Soxhlet cihazında hekzan ilavesi ile ekstrakte edilmiş ve sonrasında çözgen bir döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Toplam protein analizi ise Kjeldahl metoduna göre belirlenmiş ve protein dönüşüm faktörü olarak 6,25 kullanılmıştır (AOAC, 2000).

Çizelge 1. Glütensiz krakerlerin formülasyonları

Table 1. Formulations of gluten-free crackers

Malzemeler	Sade Kraker (g)	Nar Çekirdeği İlaveli Kraker (g)
Yeşil mercimek unu	100	70
Zeytinyağı	10	10
Toz şeker	5	5
Tuz	5	5
Badem sütü	125	125
Tarçın	5	5
Muz	50	50
Nar çekirdeği	-	30

Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan glütensiz krakerlerin kalite özelliklerini belirlemek amacıyla pişirme kaybı hesaplanmış ve renk analizi yapılmıştır. Pişirme kaybı, kraker hamurunun pişmeden önceki ağırlığı ile krakerlerin piştikten sonraki ağırlıkları arasındaki farka göre gravimetrik olarak belirlenmiş ve aşağıda verilen formül (1) kullanılarak hesaplanmıştır. Glütensiz kraker örneklerinin renk analizi Hunter renk sistemine göre (L^* , a^* ve b^*) Minolta (CR-400 Minolta, Tokyo, Japonya) renk cihazı kullanılarak yapılmıştır. L^* değeri parlaklığı (0: siyah, 100: beyaz), $+a^*$ değeri kırmızıyı, $-a^*$ değeri yeşili, $+b^*$ değeri sarıyı ve $-b^*$ değeri maviyi göstermektedir. Glütensiz krakerlerin kahverengileşme indeksi (BI) Maskan (2001) tarafından belirtilen aşağıdaki formüller (2 ve 3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$PK = \frac{KHA - PKA}{KHA} \times 100 \quad (1)$$

$$BI = \frac{100(x - 0,31)}{0,17} \quad (2)$$

$$x = \frac{(a^* + 1,75L^*)}{5,645L^* + a^* - 3,012b^*} \quad (3)$$

PK : % Pişirme kaybı

KHA: Kraker hamur ağırlığı

PKA: Pişmiş kraker ağırlığı

Fenolik Madde Ekstraksiyonu

Glütensiz krakerlerin TPC, TFC ve TAA miktarının tayin edilmesi için glütensiz krakerlerden 1 g örnek tartılarak falkon tüplerine konulmuş ve üzerine 5 mL %80'lik metanol eklenerek 30 dakika ultrasonik banyoda (Protech, Türkiye) bekletilmiştir. Sonrasında falkon tüpleri 10 dakika 4000 rpm hızda santrifüj cihazında (Thermo Scientific, ABD) santrifüj edilmiş ve sıvı kısım toplanarak yeni bir falkon tüpüne aktarılmıştır. Kalan katı kısım aynı koşullarda tekrar ekstrakte edilmiş ve elde edilen sıvı kısımlar aynı falkonda bir araya getirilerek TPC, TFC ve TAA analizleri için -20°C'de muhafaza edilmiştir (Gulsunoglu ve ark., 2020).

TPC ve TFC Miktarının Tayini

TPC miktarının belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış (Singleton ve ark., 1999) ve sonuçlar, mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g km cinsinden verilmiştir. TFC miktarı da Dewanto ve ark. (2002)'nin yöntemine göre belirlenmiş ve sonuçlar mg kateşin eşdeğeri (CE)/100 g km olarak ifade edilmiştir.

TAA Miktarının Belirlenmesi

TAA'yı belirlemek için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) antioksidan aktivite analizleri yapılmıştır. DPPH analizi, Rai ve ark. (2006)'nın yöntemine göre, CUPRAC analizi ise Apak ve ark. (2004)'nin yöntemine göre yapılmış ve sonuçlar mg trolox eşdeğeri (TE)/100 g km cinsinden ifade edilmiştir.

In Vitro Gastrointestinal Sindirim

Bu yöntem, glütensiz kraker örneklerinde bulunan fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, Minekus ve ark. (2014)'nin belirlediği yöntemle göre ağız, mide ve bağırsak sindirimi olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Tükürük, mide ve bağırsak sıvıları; farklı konsantrasyonlarda potasyum klorür, monopotasyum fosfat, sodyum bikarbonat, sodyum klorür, magnezyum klorür heksahidrat, amonyum karbonat, hidroklorik asit içermekte olup Minekus ve ark. (2014) tarafından önerilen şekilde hazırlanmıştır. Ağız sindirimini simüle etmek için 2 g liyofilize edilmiş kraker örneği 3,5 mL tükürük sıvısı, 0,5 mL amilaz (1500 U/mL) ve 25 µL kalsiyum klorür ile karıştırılmış ve 37°C'de 2 dakika boyunca çalkalayıcı inkübatörde (Miprolab, Türkiye) bekletilmiştir. Mide sindirimini simüle etmek için, karışıma 7,5 mL mide sıvısı, 1,6 mL pepsin (25000 U/mL) ve 5 µL kalsiyum klorür eklenmiş ve karışımın pH'ı 1 M HCl kullanılarak 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra 37°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmış, süre sonunda ise mideden 5 mL örnek alınmıştır. Ardından, bağırsak sindirimini simüle etmek için kalan karışıma 8,25 mL bağırsak sıvısı, 3,75 mL pankreatin (800 U/mL), 1,875 mL safra (160 mM) ve 30 µL kalsiyum klorür eklenerek, karışım pH'sı 1 M NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. Karışımlar tekrar çalkalayıcı inkübatöre yerleştirilmiş ve 37°C'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. Bağırsak sindirimi sonunda tüm örnekler toplanmış ve 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edilerek daha sonraki analizler için -20°C'de depolanmıştır. Mide ve bağırsak aşamalarında toplanan örneklerin TPC, TFC ve TAA değerleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Biyoerişilebilirlik ise sindirilmiş örneklerde (mide ve bağırsak sonrası) bulunan fenolik/antioksidan miktarının sindirilmemiş örneklerde bulunan fenolik/antioksidan miktarlarına bölünüp 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır (Kocakaplan ve ark., 2024).

Duyusal Analiz

Duyusal değerlendirme için, tanımlayıcı duyusal analiz testi kullanılmıştır. Duyusal analiz için üretilen glütensiz kraker örnekleri rastgele 3 basamaklı sayılarla tanımlanmış ve panelistlerin değerlendirmesine sunulmuştur. Panele

Beslenme ve Diyetetik, Gıda Mühendisliği ve Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü öğretim üye ve elemanlarından oluşan toplam 24 eğitilmiş panelist katılmıştır. Panelistlerden örnekleri 5 puanlık hedonik skala (1: Hiç beğenmedim, 2: Az beğendim, 3: Ne beğendim ne beğenmedim, 4: Beğendim, 5: Çok beğendim) kullanarak tat, koku, renk, sertlik, ağızda dağılma, ağza yapışma ve genel beğeni açısından değerlendirilmeleri istenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Glütensiz kraker üretimi ve tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Ortalamalar arası farklılıklar Minitab 18 (Minitab Inc. Coventry, İngiltere) programında One-way ANOVA kullanılarak, Tukey farklılık testine göre 0,05 önem düzeyinde belirlenmiştir. Değişkenler arasındaki ilişki, Pearson korelasyon katsayısı ile Microsoft Excel kullanılarak hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Glütensiz Krakerlerin Fiziksel Özellikleri

Sade ve nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakerler 0,5 cm kalınlık, 9 cm boy ve 1 cm en olacak şekilde kesilerek hazırlanmıştır. Hem sade hem de nar çekirdeği ilaveli krakerler için pişirme kaybı %50 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 2’de glütensiz krakerlerin L^* , a^* , b^* değerleri ve BI verilmiştir. L^* değerinin açıklık-koyuluk koordinatı hakkında bilgi verdiği bilinmektedir. L^* değerinin 0 olması siyahı, 100 olması ise beyazı temsil etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre sade krakerin L^* değeri 49,8 olmakla birlikte nar çekirdeği ilaveli krakerin L^* değeri 45,9 olarak bulunmuştur. Buna göre nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakerlerin sade krakerlerden daha koyu bir renge sahip olduğu söylenebilir. Krakerlerin L^* değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Ayrıca, BI değeri de işlenmiş bir gıdanın fiziksel kalitesini değerlendirmek amacıyla kullanılan başka bir renk parametresidir. Nar çekirdeği ilaveli krakerin BI değeri 51,9 iken sade krakerin BI değeri ise 46,1 bulunmuş olup nar çekirdeği ilaveli krakerin BI değeri anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. Maillard reaksiyonu, optimize edilmiş koşullar altında tüm numuneler için benzer şekilde gerçekleşse de nar çekirdeği ilavesinin renkte bir miktar değişikliğe sebep olması, ayrıca nar çekirdeğinin içerdiği şeker (%14,2 indirgen şeker, %24,4 serbest glikoz) sebebiyle nar çekirdeği ilaveli krakerlerde

daha fazla kahverengileşme görülmesi BI değerlerindeki anlamlı farklılığı açıklamaktadır (Gulsunoglu, 2019).

Kraker örnekleri incelendiğinde en yüksek a^* değeri nar çekirdeği ilaveli krakerlerde saptanmış ve sade kraker ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Eklenen nar çekirdeğinin a^* değerini artırdığı düşünülmekte olup nar çekirdeği ilaveli krakerin renginin kırmızıya daha yakın olduğu görülmüştür. Koca ve ark. (2018) yapmış olduğu bir çalışmada nar çekirdeği tozu ilave edilmiş erişte örneklerinin L^* değerleri azalırken, a^* değerlerinin ise hem pişmemiş hem de pişmiş erişteelerde arttığı rapor edilmiştir. Glütensiz krakerlerin ortalama b^* değeri sade ve nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakerlerde sırasıyla 17,2 ve 16,3 olarak bulunmuştur. İki krakerin b^* değeri karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Sade krakerin b^* değerinin daha yüksek olması renginin sarıya daha yakın olduğunu göstermektedir. Han ve ark. (2010)’nın farklı baklagil unları ile yaptığı kraker çalışmasında, kırmızı mercimek unu ile yapılan krakerlerin a^* değeri 20,5 iken yeşil mercimek, barbunya, bezelye ve nohut unu ile yapılan krakerlerin sırasıyla a^* değeri 7,8; 5,3; 5,8 ve 5,7 olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmadan da görüldüğü gibi, kullanılan hammaddenin renk değerlerine göre üretilen krakerlerin renk değerleri de farklılık göstermektedir.

Glütensiz Krakerlerin Kimyasal Kompozisyonu

Sade ve nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakerlere ait kimyasal kompozisyon sonuçları Çizelge 3’te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sade ve nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakerlerin nem oranı sırasıyla %12,2 ve %9,7 olarak bulunmuştur. Sade glütensiz krakerin nem oranının nar çekirdeği ilaveli glütensiz krakere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Krakerlerin nem miktarı arasındaki bu farklılık, nar çekirdeğinin yüksek diyet lif içeriği sebebiyle su tutma kapasitesinin artması ve buna bağlı olarak nem miktarının azalması ile açıklanabilir. Toğrul (2021)’un yaptığı bir çalışmada ise mercimek unu kullanılarak yapılan krakerlerin nem oranı %10,18 \pm 0,02 olarak bulunmuştur. Toğrul (2021)’un yaptığı çalışmadaki krakerin nem oranının bizim çalışmamızdaki sade krakerin nem oranından daha düşük, nar çekirdeği ilaveli krakerin nem oranından ise daha yüksek olduğu görülmüştür. Gül & Şen (2017) nar çekirdekleri ile zenginleştirilmiş ekme örneklerinde de nar çekirdeği ilavesi ile ekmeğin su tutma kapasitesinin arttığını ve nem miktarının düştüğünü rapor etmişlerdir.

Çizelge 2. Glütensiz krakerlerin renk değerleri

Table 2. Color parameters of gluten-free crackers

Kraker çeşitleri	L^*	a^*	b^*	BI
Sade kraker	49,8 \pm 1,1 ^a	3,0 \pm 0,2 ^b	17,2 \pm 0,5 ^a	46,1 \pm 2,5 ^b
Nar çekirdeği ilaveli kraker	45,9 \pm 1,1 ^b	5,4 \pm 0,1 ^a	16,3 \pm 0,2 ^b	51,9 \pm 1,1 ^a

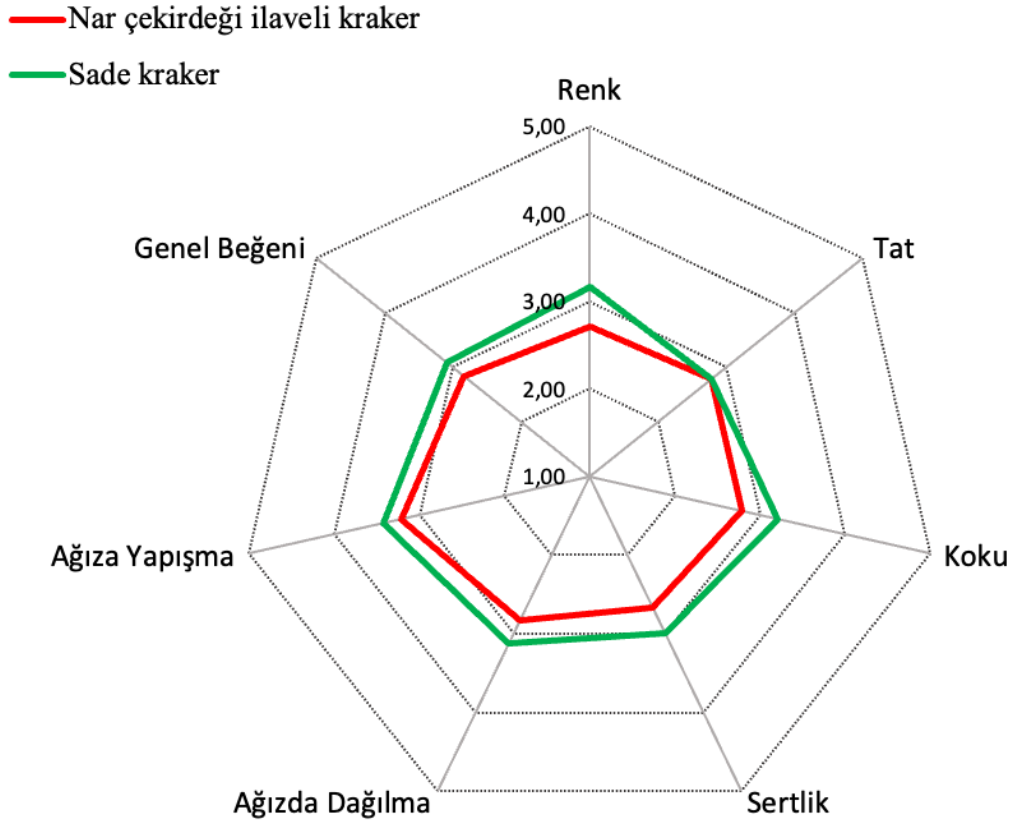
Aynı sütundaki farklı küçük harfle (a>b) gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$).

Çizelge 3. Glütensiz krakerlerin kimyasal kompozisyonu (%)

Table 3. Chemical composition of gluten-free crackers (%)

Kraker çeşitleri	Nem	Protein	Kül	Yağ	Karbonhidrat
Sade kraker	12,2 \pm 0,2 ^a	27,1 \pm 2,4 ^a	2,8 \pm 0,1 ^a	12,4 \pm 0,1 ^a	45,6 \pm 2,3 ^a
Nar çekirdeği ilaveli kraker	9,7 \pm 0,0 ^b	25,7 \pm 0,4 ^a	2,7 \pm 0,0 ^a	12,2 \pm 1,4 ^a	49,7 \pm 1,0 ^a

Aynı sütundaki farklı küçük harfle (a>b) gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$).



Şekil 1. Sade ve nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlere ait duyu analizi sonuçları
Figure 1. Sensory analysis of gluten-free crackers, plain and enriched with pomegranate seed

Nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlerin karbonhidrat içerikleri sade krakerlere kıyasla daha yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Aynı şekilde kül içerikleri de iki kraker arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P>0,05$). Glütensiz krakerlerin karbonhidrat ve kül içeriklerindeki bu benzerlik, yeşil mercimek ve nar çekirdeğinin karbonhidrat ve kül içeriğinin yakın değerlerde olmasından dolayı anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı şeklinde açıklanabilir. Nar çekirdeğinin kül ve karbonhidrat içeriği sırasıyla %3,2 ve %52,2 (Gül & Şen, 2017) iken yeşil mercimek ise %3,4 ve %61,5 oranında sırasıyla kül ve karbonhidrat içermektedir (Gharibzahedi ve ark., 2012). Nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlerin sade krakerlere kıyasla protein ve yağ içerikleri daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$).

Duyusal Analiz

Sade ve nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlerin lezzet (tat, koku), doku (sertlik, ağzda dağılma, ağza yapışma), görünüş (renk) ve genel beğeni açısından, panelistler tarafından 1 ve 5 puan aralığında değerlendirme sonuçlarını gösteren örümcek ağı diyagramı Şekil 1'de verilmiştir.

Panelistler tarafından krakerler arasında tat değerlendirmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($P>0,05$). Ancak, elde edilen skorlar ile hesaplanan beğeni yüzdesine bakıldığında hem sade hem de nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlerin beğeni yüzdesinin %55,8 olduğu görülmüştür. Toğrul (2021)'un mercimek unu kullanarak yaptığı bisküvi ve kraker

çalışması 90 panelist tarafından değerlendirilmeye alınmış ve panelistler tarafından tada 9 üzerinden 5,6 puan verilerek beğenilme yüzdesi 62,2 olarak hesaplanmıştır. Başka bir çalışmada ise vişne çekirdeği kullanılarak yapılan krakerin tadının beğenilme oranı %69,4 olarak rapor edilmiştir (Tuna, 2015). Yapılan çalışmalarda yer alan krakerlerin tat değerlendirmesindeki beğeni yüzdesi karşılaştırıldığında en fazla beğeni yüzdesinin Tuna (2015)'nin çalışmasında yer alan vişne çekirdeği kullanılarak yapılan krakerde olduğu görülmüştür. Toğrul (2021)'un çalışmasında yer alan mercimek unu kullanılarak yapılan krakerin beğeni oranı daha fazla olsa da yapılan bu çalışmadaki krakerlerin beğeni oranı ile arasında yaklaşık %5'lik bir fark olduğu görülmüştür.

Panelistler tarafından yapılan değerlendirme sonucunda sade ve nar çekirdeği ilaveli glutensiz krakerlerin koku, sertlik, ağzda dağılma, ağza yapışma, kabuk rengi ve genel beğeni puanları açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Bu durumda %10 oranında ilave edilen nar çekirdeği tozunun duyu analizi anlamında krakerlerde tüketici tarafından algılanabilir bir fark oluşturmadığı görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, krakerler arasında duyu analizi anlamında bir fark olmaması, nar çekirdeği ilavesinin tüketicilerin kraker tercihini olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

In Vitro Sindirimin Krakerlerin TPC ve TFC Miktarına Etkisi

In vitro gastrointestinal sindirim sırasında glutensiz krakerlerin TPC ve TFC miktarındaki değişimler Çizelge 4'te verilmiştir. Sindirilmemiş kraker örneklerinde nar

çekirdeği ilave edilmiş olanların TPC ve TFC miktarları sade krakerlere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Gulsunoglu ve ark. (2019) tarafından nar çekirdeğinin TPC, TFC, CUPRAC ve DPPH değerleri sırasıyla 1319 mg GAE/100 g km, 218 mg CE/100 g km, 58,35 mg TE/100 g km ve 29,00 mg TE/100 g km olarak rapor edilmiştir. Bu değerler doğrultusunda, nar çekirdeği tozunun glutensiz krakerlere ilave edilmesi ile TPC ve TFC miktarlarında sade krakerle kıyasla meydana gelen artış açıklanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada nar çekirdeğinin TPC miktarının 13,2 mg/g, TFC miktarının ise 3,8 mg/g olduğu belirlenmiştir (Gulsunoglu, 2019). Mevcut çalışmamızda %10 nar çekirdeği eklenen krakerlerde görülen bu artış beklenen düzeyden daha fazla meydana gelmiştir. Bu durumun ise kullanılan nar çekirdeğinin türü, mevsim ve iklim şartlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Mide sindirimi sonrası her iki grup kraker örneğinde de TPC ve TFC miktarı sindirilmemiş krakerlere kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). TPC ve TFC miktarında görülen bu artış mide sindirimi boyunca fenolik bileşiklerin serbest hale geçmeye devam ettiğini göstermektedir (Özdemirli & Kamiloğlu, 2022). Özellikle nar çekirdeğinde bağlı formda bulunan fenoliklerin mide asidi ile muamelesi sonrası serbest hale geçmesi bu artışı desteklemektedir (Incedayi & Turkmen Erol, 2023). Gulsunoglu ve ark. (2019)'nın yapmış olduğu bir çalışmaya göre nar çekirdeğinde bağlı formda bulunan fenolikler, toplam fenoliklerin %25'ini oluşturmaktadır. Bağırsak sindirimi sonrası hem sade hem nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TPC ve TFC miktarları artış göstermiştir. Ancak sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TFC miktarlarında bağırsak sindirimi sonrası anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Literatürde yapılmış bazı çalışmalarda da bağırsak sindirimi sonrası TPC miktarlarında artış tespit edilmiştir (Bouayed ve ark. 2011; Kamiloğlu, 2019a). Bu durum ise gıdaların bağırsak sıvıları ile teması sonucu bağırsak sıvılarında bulunan enzimlerin mevcut fenoliklerin salınımını arttırması ile açıklanabilmektedir (Özdemirli & Kamiloğlu, 2022).

In vitro gastrointestinal sindirim ile sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TPC değerlerinde bir artış görülmüş olup, biyoerişilebilirlik değerleri sindirilmemiş

krakerlere kıyasla sırasıyla %411 ve %290 olarak tespit edilmiştir. Sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TFC değerleri ise sindirilmemiş krakerlere kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur, ancak biyoerişilebilirlik değerlerinin nar çekirdeği ilaveli krakerde sade krakerlere kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, yeşil mercimek ve nar çekirdeğinin içerdiği fenoliklerin kimyasal yapısındaki farklılıklarla, diğer besin öğeleri ve gıda matrisi ile olan etkileşimleriyle açıklanabilir. Yeşil mercimek daha çok flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler içermekte olup, fenoliklerin çoğu çözünür formdadır (Rico ve ark., 2021). Ancak, nar çekirdeği daha çok elajitanenler gibi kompleks fenolikler içermekte olup, bu durum fenoliklerin sindirim esnasında salınmasını ve absorbe edilmesi zorlaştırmaktadır. Ayrıca, bu kompleks fenolikler moleküler yapı ve boyutları sebebiyle de daha az biyoerişilebilir konumdadır (Yamini ve ark., 2023).

In vitro Sindirimin Krakerlerin TAA Değerlerine Etkisi

In vitro gastrointestinal sindirim sırasında glutensiz krakerlerin TAA'sındaki değişimler CUPRAC ve DPPH analizleri kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir. CUPRAC ve DPPH antioksidan aktivite değerleri kıyaslandığında, en yüksek antioksidan aktivite değerleri CUPRAC analizi sonucunda elde edilmiştir. Bu durum, CUPRAC analiziyle hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlar ölçülebilirken, DPPH analiziyle sadece lipofilik antioksidanların ölçülebilmesi ile açıklanabilir (Özdemirli & Kamiloğlu, 2022). Sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerlerin *In vitro* sindirim sırasındaki TPC, TFC, CUPRAC ve DPPH sonuçları arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiş ve hem sade hem nar çekirdeği ilaveli krakerler için sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir. Sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerler için CUPRAC ve DPPH metodları arasında pozitif yönlü lineer bir ilişki tespit edilmiştir (sırasıyla $R^2=0,873$ ve $R^2=0,931$). Nar çekirdeği ilaveli krakerlerin *In vitro* sindirim sırasındaki TPC ve DPPH değerleri arasında ise oldukça yüksek bir korelasyon ($R^2=0,999$) tespit edilmiştir. Nar çekirdeği ilave edilmiş krakerlerin içerdiği TPC miktarının artmasıyla krakerlerin DPPH antioksidan aktivitesinin de aynı şekilde arttığı görülmektedir.

Çizelge 4. *In vitro* sindirim sırasında glutensiz krakerlerin TPC, TFC ve TAA miktarında meydana gelen değişimler
Table 4. Changes in TPC, TFC and TAA content of gluten-free crackers during simulated *In vitro* digestion

Örnekler	Sindirim Öncesi	Mide Fazı	Bağırsak Fazı	Biyoerişilebilirlik
Toplam Fenolik Madde (TPC) (mg GAE/ 100 g)				
Sade Kraker	104,6±11,0 ^{b, C}	214,5±6,6 ^{b, B}	430,3±23,3 ^{b, A}	%411
Nar çekirdeği ilaveli kraker	182,8±6,1 ^{a, C}	246,6±24,5 ^{a, B}	530,2±10,4 ^{a, A}	%290
Toplam Flavanoid Madde (TFC) (mg CE/ 100 g)				
Sade Kraker	21,1±1,1 ^{b, C}	30,5±1,6 ^{b, B}	40,0±2,2 ^{a, A}	%190
Nar çekirdeği ilaveli kraker	25,6±0,0 ^{a, B}	43,6±3,0 ^{a, A}	49,2±7,6 ^{a, A}	%192
Toplam Antioksidan Aktivite (TAA) (mg TE/100 g)				
CUPRAC				
Sade Kraker	230,2±6,2 ^{b, B}	221,1±14,5 ^{b, B}	375,7±26,9 ^{b, A}	%163
Nar çekirdeği ilaveli kraker	359,9±7,1 ^{a, B}	389,3±30,6 ^{a, B}	572,1±17,3 ^{a, A}	%159
DPPH				
Sade Kraker	65,4±3,7 ^{b, C}	95,5±1,2 ^{b, B}	133,5±6,2 ^{b, A}	%204
Nar çekirdeği ilaveli kraker	89,8±3,8 ^{a, C}	134,6±16,7 ^{a, B}	183,1±10,4 ^{a, A}	%204

*Ortalama değer±standart sapma. Aynı sütunda farklı küçük harfle (a>b) gösterilen ortalamalar krakerler arası anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$). Aynı satırda farklı büyük harfle (A>B>C) gösterilen ortalamalar ise aynı kraker örneğinde farklı *In vitro* sindirim aşamalarında görülen anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$).

Çizelge 5. Pearson korelasyon katsayıları (sade kraker; nar çekirdeği ilaveli kraker)

Table 5. Pearson correlation coefficients (plain cracker; cracker enriched with pomegranate seed)

	TPC	TFC	CUPRAC	DPPH
TPC	1	0,983; 0,799	0,993; 0,947	0,925; 0,999
TFC		1	0,840; 0,771	0,998; 0,950
CUPRAC			1	0,873; 0,931
DPPH				1

CUPRAC antioksidan aktivite sonuçlarına göre, sindirilmemiş krakerlerin TAA değerleri ile mide sindirimi sonrası hem sade hem de nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TAA değerleri arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bağırsak sindirimi sonrası ise hem sade hem de nar çekirdeği ilaveli krakerlerin CUPRAC antioksidan aktivite değerlerinde artış meydana gelmiştir. DPPH antioksidan aktivite sonuçlarına göre ise, sindirilmemiş krakerlerin TAA değerleri ile mide sindirimi sonrası hem sade hem de nar çekirdeği ilaveli krakerlerin TAA değerleri kıyaslandığında mide sindirimi sonrası anlamlı bir artış görülmüş ve bu artış bağırsak sindirimi sonrası da devam etmiştir. Sade ve nar çekirdeği ilaveli krakerlerin antioksidan sonuçlarına göre krakerlerin biyoerişilebilirlikleri arasında kayda değer bir fark tespit edilememiştir. Kamiloğlu (2019b) yapmış olduğu bir çalışmada mide ve bağırsak sindirimi sonrası CUPRAC, DPPH ve FRAP antioksidan metodlarına göre anlamlı bir artış tespit etmiştir. ABTS metodunda ise mide sindirimi sonrası anlamlı bir değişim gözlenmezken bağırsak sindirimi sonrası anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu durum ise antioksidan ölçüm metodlarının mide ve bağırsak pH'larına göre ölçüm kapasitesinin farklılaşması ile açıklanmıştır (Kamiloğlu, 2019b).

Sonuç

Bu çalışmada, nar çekirdeği tozunun besin ögesi içeriği yönünden geliştirilmiş ve duyuşal olarak kabul edilebilir glutensiz kraker üretiminde kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Ayrıca, *In vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak nar çekirdeği tozu ile zenginleştirilmiş mercimek unlu glutensiz krakerlerde bulunan fenolik ve antioksidan bileşiklerin biyoerişilebilirliği değerlendirilmiştir. Nar çekirdeği tozunun glutensiz krakerlere ilave edilmesi ile hem sindirilmemiş hem de mide ve bağırsak sindirimi sonrası krakerlerin TPC, TFC ve TAA değerlerinde artış meydana gelmiştir. Duyusal değerlendirmeler ile, nar çekirdeği tozu ilavesinin panelistler tarafından krakerlerin duyuşal özelliklerinde olumsuz bir değerlendirmeye sebep olmadığı görülmüştür. Elde edilen bu bulgular, sağlığı destekleyen ve atıkların değerlendirilmesi için çevre dostu çözümler sağlayan fonksiyonel gıdaların geliştirilmesine dair fikir sunmaktadır. Ayrıca, fonksiyonel özellikler kazandırılmış glutensiz krakerlerin çölyak hastaları için alternatif bir ürün olabileceği ve glutensiz ürün pazarının genişlemesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Beyan

Teşekkür

Krakerlerin üretilmesi sırasında verdikleri destekten dolayı Mustafa Alkan, Melisa Üzer ve Melissa Keleş'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C. M., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry*, 215, 318-325.
- AOAC (2000). Official methods of analysis of the association of analytical chemists. (17th ed.) *Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, Virginia, USA.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Ashoush, I. S., & Gadallah, M. G. E. (2011). Utilization of mango peels and seed kernels powders as sources of phytochemicals in biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 35-42.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Gharibzadeh, S. M. T., Mousavi, S. M., Jafari, S. M., & Faraji, K. (2012). Proximate composition, mineral content, and fatty acids profile of two varieties of lentil seeds cultivated in Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 976-978. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0119-2>
- Gholipour, A., Sadegheh, A., Mostafaeipour, A., & Fakhrzad, M. B. (2024). Designing an optimal multi-objective model for a sustainable closed-loop supply chain: a case study of pomegranate in Iran. *Environment, Development and Sustainability*, 26(2), 3993-4027. <https://doi.org/10.1007/s10668-022-02868-5>
- Gulsunoglu, Z. (2019). *Valorization of industrial food wastes by production of phenolic antioxidants via fermentation with newly isolated Aspergillus spp.* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Gulsunoglu, Z., Karbancioglu-Guler, F., Raes, K., & Kilic-Akyilmaz, M. (2019). Soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of various industrial plant wastes. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1501-1510. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1656233>
- Gulsunoglu, Z., Purves, R., Karbancioglu-Guler, F., & Kilic-Akyilmaz, M. (2020). Enhancement of phenolic antioxidants in industrial apple waste by fermentation with *Aspergillus* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101562. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101562>
- Gül, H., & Şen, H. (2017). Effects of pomegranate seed flour on dough rheology and bread quality. *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 622-628. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1327461>

- Han, J. J., Janz, J. A., & Gerlat, M. (2010). Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Research International*, 43(2), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.015>
- Incedayi, B., & Erol, N. T. (2023). Assessment of the Bioaccessibility of *Elaeagnus angustifolia* L. Flour and Its Use in Cracker Formulation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 78(1), 201-206. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01041-7>
- Kamiloglu, S. (2019a). Taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında polifenol biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi. *Gıda*, 44(3), 409-418. <https://doi.org/10.15237/gida.gd19026>
- Kamiloglu, S. (2019b). Endüstriyel dondurma işlemi ve *In vitro* gastrointestinal sindirim sırasında taze fasulyenin fenoliklerinde, flavonoidlerinde ve antioksidan kapasitesinde meydana gelen değişimler. *Akademik Gıda*, 17(2), 176-184. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.613559>
- Koca, I., Tekguler, B., Yilmaz, V. A., Hasbay, I., & Koca, A. F. (2018). The use of grape, pomegranate and rosehip seed flours in Turkish noodle (erişte) production. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13343.
- Kocakaplan, Z. B., Ozkan, G., Kamiloglu, S., & Capanoglu, E. (2024). Valorization of pineapple (*Ananas comosus*) by-products in milk coffee beverage: Influence on bioaccessibility of phenolic compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1-8.
- Mala, T., Piayura, S., & Itthivadhanapong, P. (2024). Characterization of dried pineapple (*Ananas comosus* L.) peel powder and its application as a novel functional food ingredient in cracker product. *Future Foods*, 9, 100322. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100322>
- Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48(2), 169-175. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00154-0)
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *In vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Özdemirli, N., & Beştepe, S. K. (2022). Kavun çekirdeği şerbetinde (sübye) fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi. *Gıda*, 47(6), 1130-1139. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22083>
- Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B. P., & Mukherjee, P. K. (2006). Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3), 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.025>
- Rico, D., Peñas, E., del Carmen García, M., Rai, D. K., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Martín-Diana, A. B. (2021). Development of antioxidant and nutritious lentil (*Lens culinaris*) flour using controlled optimized germination as a bioprocess. *Foods*, 10(12), 2924.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sönmezdağ, A., S. (2021). Nar (*Punica Granatum* L.). İçinde M. Arslan (Ed.), Fonksiyonel Besinlerin Sağlıkta Rolü (pp. 8-30). *Güven Plus Grup A. Ş. Yayınları*.
- Toğrul, İ. (2021). Göleveze (*Colocasia esculenta* (L.) schott) unu ilavesinin glutensiz krakerlerin besleyici ve duyuşal özelliklerine etkisi (Tez no. 673666) [Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Tomić, J., Popović, L., Maravić, N., Stupar, A., Sedlar, T., & Plavšić, D. (2024). Gluten-Free Crackers Using Chickpea and Pumpkin Seed Press Cake Blend: Effects of Gastrointestinal Digestion. *Food Bioscience*, 60, 104534. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104534>
- Tuna, H. E. (2015). Gıda atığı olan vişne, nar, kabak ve kayısı çekirdeklerinin kek üretiminde değerlendirilmesi (Tez no. 418964) [Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Urgancı, U., & Isık, F. (2021). Quality characteristics of biscuits fortified with pomegranate peel. *Akademik Gıda*, 19(1), 10-20. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.927462>
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.
- Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., & Arsić, A. (2019). Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. *Current Pharmaceutical Design*, 25(16), 1817-1827.
- Yamini, S., Paswan, V. K., Shehata, A. M., Choubey, M., Bunkar, D. S., & Venkatesh, V. (2023). Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A review on nutritional profile, functional food properties, health benefits, and safety aspects. *Annals of Phytomedicine*, 12(1), 93-104.
- Zoair, A., Attia, S., Abou Garbia, A., & Youssef, M. (2019). Utilization of orange, banana and potato peels in formulating functional cupcakes and crackers. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 13(2): 11-18. <https://doi.org/10.12816/0038409>



Enhancing Culinary Operations Through Fuzzy Logic: A Case Study in the Catering Industry

Murat Doğan^{1,a,*}

¹Istanbul Gelişim University, Faculty of Fine Arts, Department of Gastronomy and Culinary Arts, TR-34310, Istanbul, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 02.08.2024

Accepted : 07.09.2024

Keywords:

Fuzzy logic

Catering

Gastronomy

Business impact analysis

Critical business processes

ABSTRACT

This study aimed to analyze the business impact of the catering sector using the fuzzy logic method. The research was conducted at a catering company in Istanbul, utilizing document review and participant observation methods to evaluate the business impact. The nominal prioritization method was used to identify critical business processes, and a model along with a mathematical formula was developed for calculating the business impact. The Fuzzy Logic Designer Toolbox in MATLAB was utilized for this calculation. The study identified eight critical business processes: (1) material supply, (2) material storage, (3) pre-preparation process, (4) cooking process, (5) portioning, (6) shipping, (7) hygiene and food safety, and (8) customer relationship management. The business impact was assessed using classical and fuzzy logic methods, and the results were compared. The fuzzy logic method provided a more flexible and comprehensive assessment, managing uncertainty and variability more effectively than classical logic. Overall, it proved to be more effective in optimizing business processes, offering a more dynamic and holistic approach to improving and prioritizing these processes.

^a mdogan@gelisim.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0001-6391-4887>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Nutrition is a basic need, and everyone has the right to be fed healthy and safe foods. To protect public health, individuals need to be fed from the right sources (Walls et. al, 2019). Catering businesses meet this need by providing mass feeding services (Doğan & Ay, 2020). The word “catering” means mass catering services, and its origin is based on the word “cater” (to provide food and drink). These businesses offer services with pre-agreed menus and prices (Doğan, 2018).

Catering businesses provide food and beverage services and meet the nutritional needs of staff and guests in various facilities. These businesses encompass many different disciplines and offer a wide range of products. Their organizational structure is complex and differs from that of other food companies (Doğan & Tekiner, 2021). Depending on the scope of activity, they can be classified as on-site production or transported food service. Businesses that produce meals on-site prepare meals using the customer's kitchen. Businesses that provide transported food services cook their meals in their central kitchens and deliver them to customers (Doğan, 2022). Today, in developed countries, 70% of the population eats at least one meal a day in institutions that provide mass feeding services (İlbay & Ay, 2021).

Catering businesses carefully organize a series of processes, such as menu planning, purchasing, storage, preparation, cooking, and service (Scanlon, 2012). Menu planning is done carefully according to customer preferences and nutritional requirements. At this stage, catering businesses aim to increase customer satisfaction by offering a variety of food options (Mutlu et. al, 2022). The purchasing process ensures that quality, fresh ingredients are sourced. Catering companies carefully select the suppliers of ingredients and strive to buy the best ingredients at the most affordable prices (İkinci & Tipi, 2021).

Storage involves keeping purchased materials in appropriate conditions. This stage is acutely important to maintain the freshness of the ingredients and prevent waste. Complying with hygiene standards during storage is one of the basic principles of catering businesses. (Shaikh et. al., 2019). In the preliminary preparation phase, the ingredients are made ready for cooking. This process includes chopping the ingredients, marinating them, and other preparation operations. Pre-preparation speeds up the cooking process and ensures that meals are served to customers in less time (Özçakmak & Gül, 2016).

The cooking phase is one of the most critical processes in catering service. Great attention is paid to cooking techniques to provide customers with delicious and healthy meals. Catering establishments prepare a variety of dishes using different cooking methods (Lobefaro, 2021). Finally, the service phase involves presenting the prepared dishes to customers. Service is of great importance in terms of presenting meals aesthetically and ensuring customer satisfaction (Shadiyev, 2021).

Unlike other sectors, the catering sector includes all the features of both the production and service sectors. Businesses operating in this sector try to keep their service quality at the highest level while managing their production processes effectively. The expectation of providing uninterrupted and adequate quality service to customers is one of the cornerstones of the catering industry (Ying-Yen, 2022). Therefore, catering businesses meticulously plan and implement all processes to ensure customer satisfaction. In this context, catering sector businesses, like other sector companies, strive to continuously improve their production processes within the scope of total quality management. Catering industry production processes contain complex and uncertain variables for many reasons (Khan et. al, 2020). Therefore, fuzzy logic can be used as a useful and alternative tool for improving production processes.

Classical logic is based on the works of Aristotle and is the most basic and widespread type of logic (Duncombe & Dutilh Novaes, 2016). Classical logic is a system of logic that makes a clear distinction within the framework of certain rules and principles as a way of thinking. According to classical logic, propositions are either true (1) or false (0), and there is no third state (intermediate state). While classical logic makes a clear and precise distinction, fuzzy logic can better express uncertainty and ambiguity and is more effective in modeling real-life uncertainties (Nadaban, 2021). Fuzzy logic is a type of logic and a mathematical concept that deals with approximate reasoning rather than being fixed and precise (Doğan, 2024).

Fuzzy logic consists of four main components: fuzzy sets, fuzzy logic operators, fuzzy rules, and fuzzy inference. In traditional set theory, an element either belongs to a set or does not, but in the fuzzy sets approach, elements can have degrees of membership ranging from 0 to 1. Fuzzy logic operators include operations such as “and,” “or,” and “not,” and these operators determine the resulting fuzzy sets by operating on membership values (Peckol, 2021). Fuzzy rules represent expert knowledge through linguistic expressions such as “if” and “then” and define relationships between input-output variables. The fuzzy inference process consists of three steps: fuzzification, rule evaluation, and defuzzification. Fuzzy logic offers a flexible and intuitive approach to dealing with uncertainty and modeling complex problems (Serrano, 2021).

In kitchens, fuzzy logic can increase efficiency in areas such as cooking processes, determining cooking degrees and times, adjusting ingredient quantities, and personalizing recipes. It ensures that food is consistently cooked to the desired level by controlling uncertain parameters more precisely in cooking processes. Cooking temperatures and times can be flexibly adjusted depending on factors such as the type and thickness of the ingredients. Ingredient quantities in recipes can be adjusted with uncertain and imprecise amounts, and suitable substitute ingredients can be suggested (Doğan, 2024).

Fuzzy logic can also be effective in areas such as menu planning, pricing, and inventory management. It recommends popular and profitable menu items by analyzing factors such as ingredient availability, customer preferences, and seasonal trends (Tom & Annaraud, 2021). Additionally, inventory management minimizes waste and reduces costs by predicting demand. Fuzzy logic can help food and beverage kitchens operate more efficiently, produce better-quality food, and improve the customer experience (Rajaratnam & Sunmola, 2023). Considering that decision-making mechanisms in the catering industry involve uncertainty, fuzzy logic management is likely to contribute to improving these processes.

This study is aimed at determining the business impacts caused by possible business interruptions in the production processes of kitchens operating in the catering sector by using the fuzzy logic method and thus contributing to the improvement of the processes. In this context, it is aimed at managing the uncertainties and variables encountered in catering kitchens more effectively. In an environment full of uncertain parameters and variables, processes such as material supply, storage, preliminary preparation, cooking, portioning, shipment, hygiene, and customer relations will be emphasized. Thus, the efficiency of the kitchens will increase, and customer satisfaction and service quality will also increase. These improvements will increase the competitiveness of catering businesses and enable them to be more successful in the sector.

Materials and Methods

The sample was limited to Istanbul, and after the initial sample was determined using the snowball technique, suggestions for additional samples were requested. In this study, the improvement of kitchen production processes in the catering industry was evaluated using the fuzzy logic method within the context of business impact analysis. Critical business functions, which are key parameters in the business impact analysis of kitchen production processes, were identified along with the potential damages that disruptions in these functions could cause. Subsequently, the production processes of a company that produces an average of 5,000 meals per day, representing the catering industry, were analyzed and compared using both classical logic and fuzzy logic methods.

Population and Sample

The main population of the research consists of catering sector companies and is limited to the Istanbul sample. This means that the identified city is considered a representative sample of the primary population covering the catering industry across Turkey. The research sample was created using the maximum diversity method, and the companies were selected accordingly. Maximum diversity sampling aims to create a relatively small sample and to reflect the diversity of individuals who may be a party to the research in this sample to the maximum extent (Levitt, 2021). The snowball technique, one of the most convenient sampling methods, was used in sample selection, and five companies were contacted via phone call and email. A catering business that agreed to participate in the study was examined on-site (Parker et. al, 2019).

Examining Kitchen Production Processes and Identifying Critical Business Functions

Kitchen production processes were thoroughly examined using the document review method and the participant observation technique, one of the field research methods. The document review method involves the stages of reviewing, recording, and evaluating documents for a specific purpose. The primary advantage of this method is its high reliability, as the text remains unchanged during the data collection process (Morgan, 2022).

The participant observation technique entails the researcher actively participating in the community or group being observed (Hurst, 2023). This approach allows the researcher not only to observe from the outside but also to engage directly with the group. Such direct interaction and observation enhance the reliability of data collection. Additionally, this technique enables the researcher to study participants in their natural environments (Rose & Johnson, 2020). This examination identified critical functions within these processes and the potential business impacts of disruptions to these functions.

To prioritize these critical business functions, we used the nominal prioritization method. This method, often employed to condense a large list of options into key priorities, helped rank the identified business processes based on their criticality. The reliability of the nominal prioritization method has been validated in numerous studies.

Business Impact Analysis

Business impact analysis involves estimating the damage businesses may suffer due to potential interruptions from threats and dangers during critical business processes (Silvius & Schipper, 2014). According to the ISO 22301 Standard, it is the process of analyzing the potential impacts of business interruptions. In essence, business impact analysis aims to identify both the quantitative and qualitative effects of these interruptions on business operations (Wong, & Shi, 2014).

For this study, all critical processes of the business were examined, and business impact analyses were conducted. Business impact analysis forms were prepared and completed in the field. These forms help identify relevant critical activities, assess the effects if these activities are not performed, and determine the time required to resume these critical activities.

Determining Business Impact Analysis with Classical Logic Method

In the evaluation of business impact analysis, an evaluation model that includes the components of business impact was created and is given in Figure 1.

A mathematical formula based on the evaluation of various critical factors and the weighting of these factors has been developed through the business impact analysis model and is given below.

$$\text{Total Impact Score} = \sum_{i=1}^n W_i(C_i(D_i + I_i)T_i)$$

∑ Represents the sum of the work functions. W_i is the weight of each work function. C_i is the criticality degree of each work function. D_i is the amount of direct loss that will occur in case of failure of each work function. I_i is the

amount of indirect damage that will occur in case of failure of each work function. T_i is the recovery time in case of failure of each work function.

Determining Business Impact Analysis with Fuzzy Logic Method

Fuzzy logic is an approach that helps model uncertainty and uncertain information (Zadeh, 2023). By using fuzzy logic for business impact analysis, it is possible to evaluate critical variables and their effects more flexibly and precisely. Four steps are proposed for the business impact analysis process, namely (1) Determination of input variables, (2) Definition of fuzzy sets, (3) Creation of fuzzy rules, and (4) Fuzzy inference system, and are given in Table 1.

In the evaluation of business impact analysis with the fuzzy logic method, the Fuzzy Logic Designer Toolbox of MATLAB (R2024a Update 3) was used due to the availability of ready libraries among programming languages and ease of operation (Kaviranjanii & Rangasamy, 2024). The Mamdani method was used in the fuzzy inference and defuzzification process in the MATLAB Fuzzy Logic Designer Toolbox. The output in the Mamdani method is a fuzzy result set (Kubat, 2016). The study does not require ethics committee approval.



Figure 1. Business impact analysis evaluation model

Table 1. Stages of business impact analysis with fuzzy logic method

S	BIAS	Definition
1	Determination of input variables	Critical variables to be used in business impact analysis for the fuzzy logic model are determined.
2	Defining fuzzy sets	Membership functions are created for each variable.
3	Generating fuzzy rules	Business impact analysis is performed using fuzzy rules.
4	Fuzzy inference system	Using the fuzzy logic system, input variables are evaluated and results are obtained. <ul style="list-style-type: none"> • Fuzzification • Rule evaluation • Includes the steps of clarification.

S: Steps; BIAS: Business Impact Analysis Stages

Result and Discussion

The company's documents were reviewed, and field research was conducted over three months, from March to June 2024. Using business impact analysis forms, all production processes were listed, sub-processes were defined, and their criticality was assessed. Seven main processes and fourteen sub-processes were identified. Experts were asked to rank these processes based on their criticality levels, highlighting the most critical ones.

The numerical values for the parameters used in the business impact analysis were determined according to specific scales or evaluation criteria. Total impact scores were calculated using mathematical methods. Additionally, a business impact analysis was performed using a fuzzy logic model, with the results evaluated through the MATLAB Fuzzy Logic Designer Toolbox. The outcomes were compared between classical logic and

fuzzy logic methods. The detailed findings and evaluations of the study are presented under specific headings.

Determination of Kitchen Production Processes and Critical Business Functions

Business impact analysis forms were used to identify kitchen production processes and critical functions. All business functions within the production processes were listed in the analysis forms, and the sub-processes of each function were defined and assessed for their criticality. The goal of determining the criticality of each business function was to decide if it should be categorized as a critical business function. Detailed information on the general kitchen production processes and their criticalities, following a thorough examination of the business processes, is presented in Table 2.

Table 2. Stages, definition and criticality of business functions

	SBP	Sub-stage	Definition	Criticality status
1	Planning and Preparation	Menu Planning	Determining menus, selecting ingredients, and creating recipes.	Seasonal availability of ingredients, compliance with customer preferences, and adherence to dietary requirements.
		Material Supply	Purchasing necessary ingredients and stock management.	Ingredient quality and freshness, supply chain issues, and inventory costs.
2	Preparation and Pre-Processing	Material purchasing and control	Receiving ingredients, checking their quality, and storing them.	Delivery timing, ingredient quality control, and management of storage areas.
		Material Storage	Proper storage of ingredients (especially for products requiring a cold chain).	Storage conditions, inventory management, spoilage, and waste.
3	Portioning and Shipment	Pre-Preparation Process	Preliminary operations such as washing, chopping, etc. of ingredients.	Workforce efficiency, management of preparation time, and maintenance of food safety standards.
		In-Kitchen Logistics	Transporting ingredients within the kitchen and distributing them to workstations.	Time management, organization of workstations, and material losses.
4	Customer Relations and Improvement	Cooking Process	Cooking meals according to recipes.	Cooking time and temperature control, adherence to recipes, and avoiding over- or under-cooking.
		Assembling	The assembling of different ingredients and preparing them for presentation.	Timing, aesthetic presentation, and correct proportions of ingredients.
5	Incoming Controls and Storage	Portioning	The placing of meals appropriately in gastronomy tubs and thermoboxes.	Selection of appropriate gastronomy tubs and boxes, packaging speed and efficiency, and maintenance of food temperature.
		Shipment	Delivering meals to customers on time.	Shipping logistics, traffic, and accurate time management.
6	Cooking and Processing	Quality Control	Checking the compliance of products with quality standards.	Ensuring process consistency, meeting quality standards, and gathering customer feedback.
		Hygiene and Food Safety	Ensuring sanitation and food safety.	Monitoring hygiene practices, employee training, and mitigating cross-contamination risks.
7	Quality Control and Hygiene	Customer Relationship	Obtaining and analyzing customer feedback.	Collecting and evaluating feedback to eliminate dissatisfaction.
		Continuous Improvement	Determining and improving deficiencies in processes.	Increasing productivity, optimizing processes, and enhancing employee motivation and training.

SBP: Stage of the business process

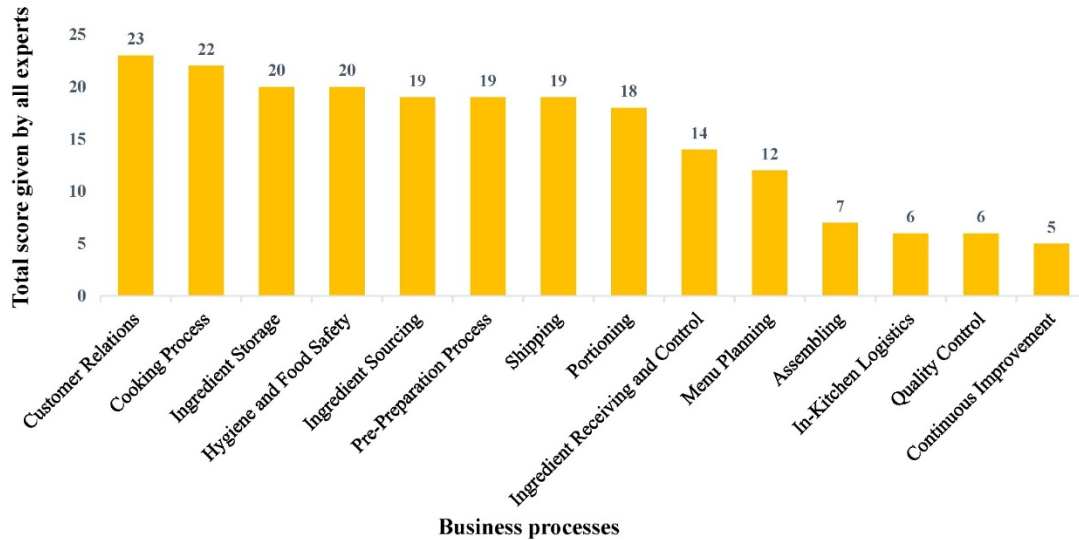


Figure 2. Prioritization findings of business processes in terms of their criticality.

Fourteen business processes were evaluated according to their priority scores, and it was decided to include (1) material supply, (2) material storage, (3) pre-preparation process, (4) cooking process, (5) portioning, (6) shipping, (7) hygiene and food safety, and (8) customer relations processes within the scope of critical business processes.

Table 3. Parameters and evaluation scales used in business impact analysis

P	Definition	Value Range	How was it determined?
C	It expresses how critical the business function is to the business.	It takes a value between 0 and 1. 0 means the lowest criticality, and 1 means the highest criticality.	Determined using expert opinions, business experience, and historical data. For example, a vital business function may receive a value between 0.9 and 1, while a less critical function may be evaluated between 0.1 and 0.3.
D	A direct financial loss will occur in the event of a disruption of the business function.	It is a positive number (for example, 5000 or 100000₺). It is determined using real financial data.	Estimated using financial reports, historical cost analysis, and accounting records.
I	Indirect losses that will occur in the event of a disruption of the business function (e.g., loss of customers, loss of reputation).	It is a positive number (for example, 5000 or 10000₺). It is determined using real financial data and estimates.	Indirect losses are estimated using the business's experience and expert opinions.
T	Time required for recovery in case of disruption of the business function.	It is a positive number (for example, 1 hour or 5 hours).	Determined using operational data and historical recovery periods.
W	It expresses the relative importance of the business function to the business.	It takes a value between 0 and 1. 0 means the lowest importance, and 1 means the highest importance.	Determined using the relative importance level determined by business managers and experts.

P: Parameter; C: Criticality Degree (C); D: Direct Loss (D); I: Indirect Loss (I); T: Recovery Time (T); W: Weight (W)

The business impact analysis forms completed during the field and document research were evaluated, identifying seven processes and fourteen sub-processes. Their criticality was then assessed. This list was presented to five experts, who were asked to rank the business functions based on their criticality. Each expert evaluated the criticality level of the fourteen stages on a scale from 0 to 5, assigning more points to more urgent critical situations. They were also allowed to assign equal points to stages if necessary. The results are presented in Figure 2.

The numerical values of the parameters used in the business impact analysis were determined within the framework of a certain scale or evaluation criteria. Table 3

explains what each parameter means, in which ranges it can take values, and how these values were decided.

Mathematical calculations were made using the total impact formula (TIS) we developed to perform the business impact analysis, and the result is below.

$$TIS = \sum_{i=1}^8 W_i \cdot (C_i \cdot (D_i + I_i) \cdot t_i) = 136.29$$

In addition, the weight (W), criticality degree (C), direct loss (1000₺), indirect loss (1000₺), total loss (1000₺), recovery time (h), and impact scores determined for each critical function are given in Table 4.

Table 4. Impact scores of critical business functions

CBF	Definition	CD	DL	IL	TL	RT	W	IS
Material Supply	Purchasing necessary ingredients and stock management.	0.9	8	4	12	2	1	17.28
Material Storage	Proper storage of ingredients (especially for products requiring a cold chain).	0.6	4	2	6	1	1	2.70
Pre-Preparation Process	Preliminary operations such as washing, chopping, etc. of ingredients.	0.7	4	3.2	7.2	1	1	4.54
Cooking Process	Cooking meals according to recipes.	0.8	16	8	24	2	1	38.88
Portioning	The placing of meals appropriately in gastronomy tubs and thermoboxes.	0.5	0.2	0.1	0.28	0.5	1	0.09
Shipping	Delivering meals to customers on time.	0.9	2	2	4	1	1	2.88
Hygiene and Food Safety	Ensuring sanitation and food safety.	0.7	0.8	1.2	2	0.5	1	0.81
Customer Relationship	Obtaining and analyzing customer feedback.	0.9	4	20	24	4	1	69.12
Total Impact Score								136.29

CBF: Critical Business Function; CD: Criticality Degree (C); DL: Direct Loss (1000₺); IL: Indirect Loss (1000₺); TL: Total Loss (1000₺); RT: Recovery Time (h); E: Weight (W), IS: Impact Score

Table 5. Input variables and membership functions of critical business functions

Critical Business Function No.	Input Variables	Defining Fuzzy Sets Membership Function
1	Material Supply	Low, Medium, High
2	Material Storage	Low, Medium, High
3	Pre-Preparation Process	Low, Medium, High
4	Cooking Process	Low, Medium, High
5	Portioning	Low, Medium, High
6	Shipping	Low, Medium, High
7	Hygiene and Food Safety	Low, Medium, High
8	Customer Relationship	Low, Medium, High

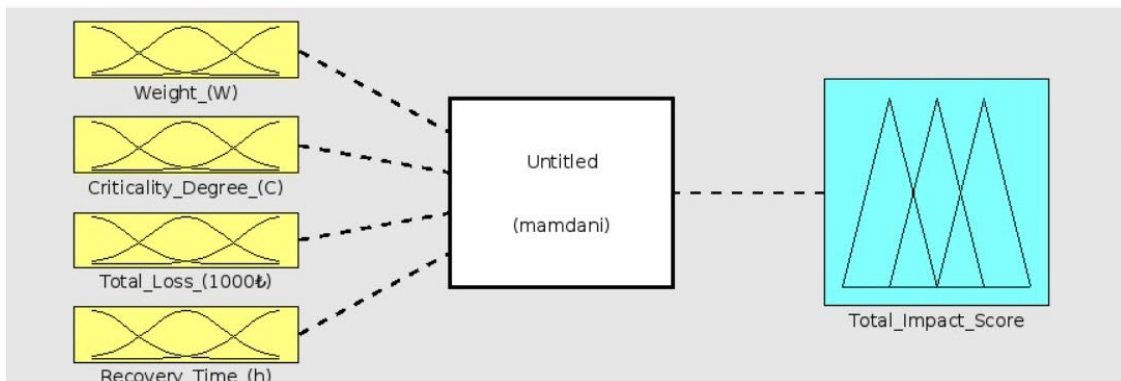


Figure 3. Created fuzzy inference system

Determining Business Impact Analysis with Fuzzy Logic Method

In determining the business impact using fuzzy logic, the critical business function parameters developed with the classical logic method and the business impact scores calculated using mathematical formulas were considered. Next, the fuzzy sets were defined, and the membership functions were determined, as shown in Table 5.

Rules were created using the MATLAB Fuzzy Logic Designer Toolbox based on the variables of the formula we developed for the business impact analysis: weight (W), criticality (C), direct damage (1000₺), and recovery time (h).

In summary, the fuzzy logic process includes fuzzification, rule evaluation, and defuzzification steps. Finally, the data was evaluated using the MATLAB program using the following steps:

MATLAB Fuzzy Logic Designer Toolbox Steps

- **Creating FIS:** A Mamdani-type fuzzy inference system (FIS) has been created, and the input and output variables have been defined and are given in Figure 3.
- **Membership Functions:** Membership functions for input variables are defined in Figure 4, and the output variable is given in Figure 5.
- **Adding Rules:** The determined rules have been added to the system and are given in Figure 6.
- **Setting Input Values:** The data set given in Table 4 was entered for each business function.
- **Running the Inference:** By running the fuzzy logic model, the job impact values were calculated by the program and are shown in Figures 7 and 8.

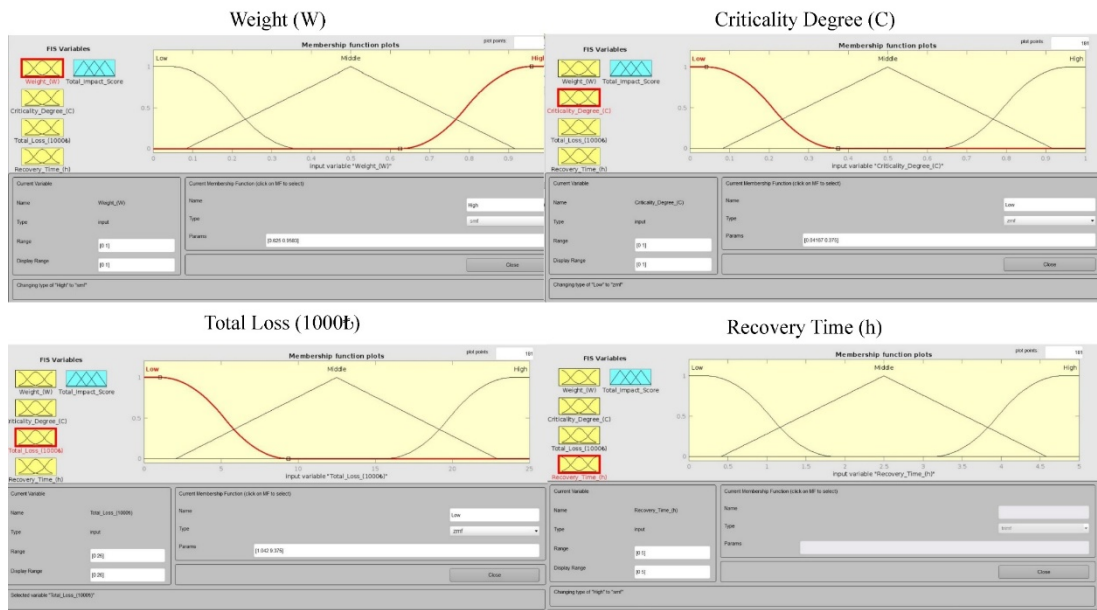


Figure 4. Membership functions for input variables

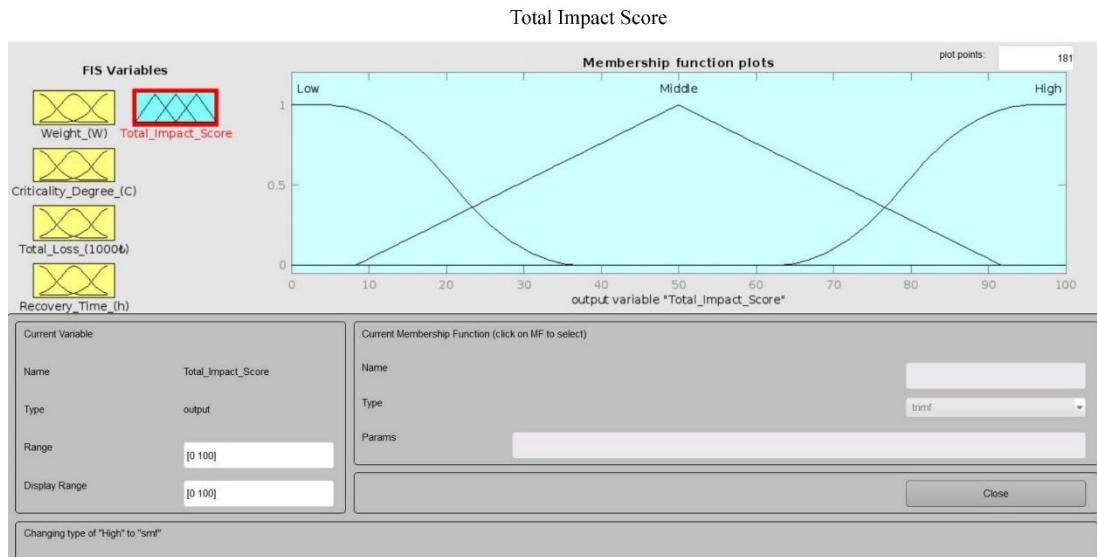


Figure 5. Membership functions for the output variable.

Table 6. Comparison of the priority order of critical business processes in terms of classical and fuzzy logic methods

n	CBF	BLM	WS	OS	BFM	WS	OS
8	Customer Relationship	69.12	50.71	1	92.70	18.67	1
4	Cooking Process	38.88	28.53	2	92.70	18.67	2
1	Material Supply	17.28	12.68	3	55.40	11.16	3
3	Pre-Preparation Process	4.54	3.33	4	51.50	10.37	5
6	Shipping	2.88	2.11	5	54.20	10.92	4
2	Material Storage	2.7	1.98	6	50.00	10.07	6
7	Hygiene and Food Safety	0.81	0.59	7	50.00	10.07	7
5	Portioning	0.09	0.07	8	50.00	10.07	8
	Total Impact Score	136.30	100.00	Total Impact Score	496.50	100.00	

CBF: Critical Business Function; BLM: Business impact score calculated by classical logic method; WS: Weighted percentage (%) of business impact score; OS: Order of priority of business impact scores; BFM: Business impact score calculated by fuzzy logic method

The comparison of the results of the results of the business impact analysis obtained through classical logic and fuzzy logic is given in Table 6.

Table 6 compares the prioritization of critical business processes using classical logic and fuzzy logic methods. Business impact scores were calculated with both approaches, and the resulting priority orders were analyzed.

In the classical logic evaluation, the “customer relationship” function received the highest business impact score, placing it at the top of the list. This was followed by the “cooking process” and “material supply” processes. Lower scores were assigned to other processes, establishing their respective priority orders.

In contrast, the fuzzy logic analysis also placed “customer relationship” and “cooking process” in the top

two positions. However, in this method, some processes received higher scores than they did under classical logic, resulting in a shift in their priority ranking. Notably, the “pre-preparation process” and “shipping” processes scored higher in the fuzzy logic method and moved up in the rankings.

Rajaratnam & Sunmola (2023) evaluated the effectiveness of the supply chain application in the airline catering sector using fuzzy logic. Similar to our study, they proposed a model for the effectiveness of supply chain applications in the airline catering sector using fuzzy logic. While the related study proposed a model for the effectiveness of only one part of the sector, our study covers all business processes.

These differences underscore the fuzzy logic method's ability to better handle uncertainty and variability. By

assessing the impact levels of processes more flexibly, this method provided a more nuanced and comprehensive prioritization than classical logic. As a result, fuzzy logic appears to be more effective in optimizing and prioritizing business processes.

The business impact scores and their percentage weighted ratios calculated with the classical logic method have a more limited range (highest 50,71%, lowest 00,7%) and offer a clearer ranking. However, the scores calculated with the fuzzy logic method have a much wider range (highest 18.67%, lowest 10.07%) and provide a more flexible assessment. This shows that the fuzzy logic method can take into account a wider range of uncertainty and variability.

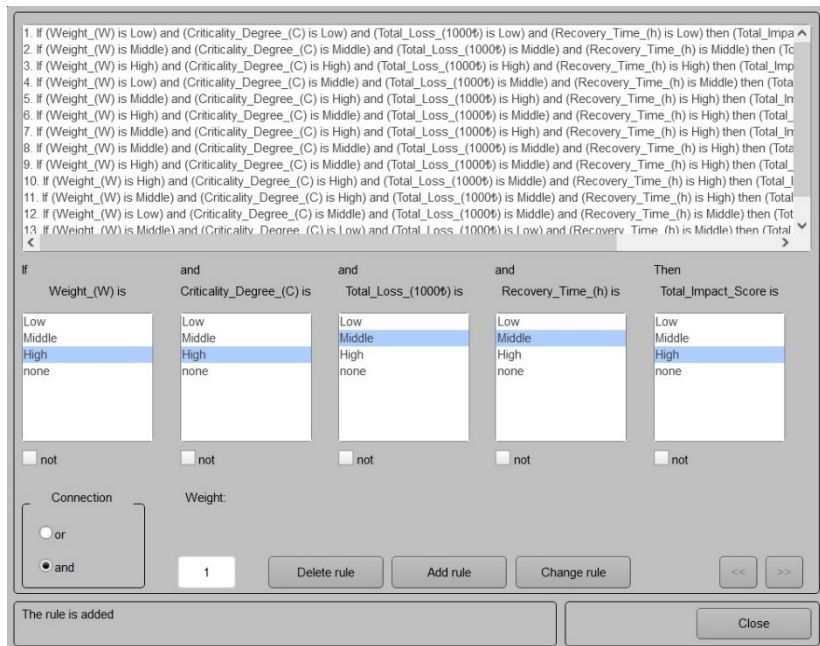


Figure 6. Fuzzy logic rules

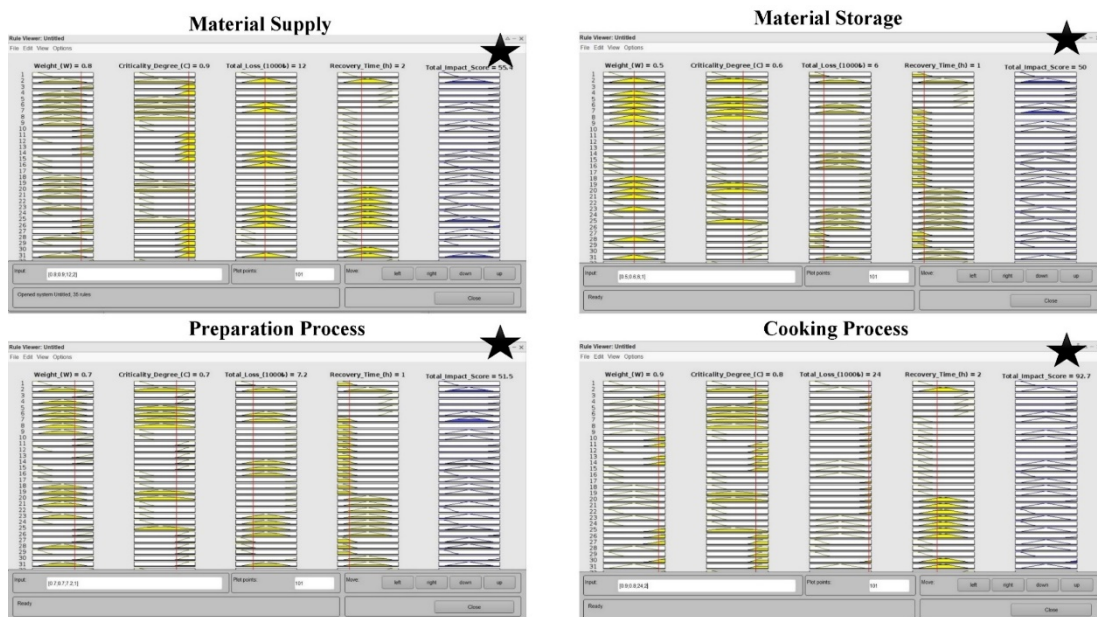


Figure 7. Business impact values of the parameters of material supply, material storage, pre-preparation process, and cooking process from critical business processes.



Figure 8. Business impact values of critical business processes such as portioning, shipping, hygiene and food safety, and customer relations parameters.

Bingöl et al. (2022) conducted a study to increase the effectiveness of using robots in restaurants, hotels, and catering businesses. In the study, they used the fuzzy logic method to classify plates with known dimensions. When they examined the fuzzy logic results, they determined that the plate type selection was successful and the prediction rate was close to one hundred percent accurate. Similarly, our study showed that the fuzzy logic method can account for a wider range of uncertainty and variability. Therefore, it was seen that fuzzy logic can better manage uncertainty and variability and that business processes are better optimized and successful due to more flexible decisions.

In the classical logic method, the percentage ratios of the business impact scores show a very sharp and distinct distribution, indicating that the classical logic method offers a more rigid and limited perspective when determining critical business functions. Kahraman et al. (2004) used the fuzzy logic method to develop an analytical tool for selecting the best catering companies that provide a high level of customer satisfaction. For this purpose, they interviewed three catering companies and identified the criteria that customers use to choose these services. Initially, the companies were compared using the Analytical Hierarchy Process (AHP), and then the fuzzy logic hierarchy was applied for comparison. Their findings indicated that fuzzy logic produced better and more successful results.

Similarly, in our study, the fuzzy logic method outperformed the classical logic method, offering a more dynamic and holistic approach to optimizing business processes. The study's findings demonstrate that the fuzzy logic method was more effective in achieving successful outcomes. In the fuzzy logic method, the percentage-weighted ratios are distributed more evenly. For example, functions such as “pre-preparation process” and “shipping” are ranked higher because they are evaluated at higher rates compared to classical logic. This shows that fuzzy logic can better manage uncertainty and variability and determine the order of importance of business processes more flexibly.

The fuzzy logic method can be more effective in improving and prioritizing business processes compared to the classical logic method. While classical logic provides more precise and rigid results, the fuzzy logic method offers a more comprehensive assessment by handling variability and uncertainty more flexibly. This better reflects the complexity and uncertainty of business processes in the real world. These findings show that the fuzzy logic method offers a more dynamic and holistic approach to business processes so that businesses can make more flexible decisions while optimizing their processes.

Çakır & Ulukan (2021) proposed a new fuzzy control system for evaluating in-flight catering customer satisfaction. The implementation and design of the control system were simulated multiple times, and the results were assessed through graphical and visual analysis. In our study, we propose a similar system to enhance the business processes of catering enterprises. Our findings indicate that this system when evaluated using the fuzzy logic method, proved to be more functional and effective.

Conclusion

Catering businesses are essential for providing large-scale nutritional services, and they must expertly manage every step of the process, from menu planning and purchasing to storage, preparation, cooking, and service. The fuzzy logic method serves as an effective tool for managing and improving uncertainties in these processes. Additionally, applying fuzzy logic enhances the efficiency of catering kitchens, boosts customer satisfaction, and improves service quality. These advancements increase the competitiveness of catering businesses and enable them to achieve greater success in the industry.

This study focuses on improving the business impact analysis of kitchen production processes in the catering sector using the fuzzy logic method. Conducted on a catering company in Istanbul, the research compares classical logic and fuzzy logic methods. The goal was to identify critical functions and assess the potential impact

on the business if these functions were disrupted. Kitchen production processes were analyzed through document reviews and participant observation methods, identifying critical functions and potential business risks.

The business's essential functions were ranked using the nominal prioritization method. During the business impact analysis, critical processes were evaluated, and the potential impacts of business interruptions were analyzed. In addition to the classical logic method, the fuzzy logic method was employed to model uncertainty and manage ambiguous information. MATLAB's Fuzzy Logic Designer Toolbox facilitated this analysis, enabling a more flexible and precise evaluation of critical variables and their impacts.

Field studies and document reviews were conducted from March to June 2024 to identify critical processes. Seven main processes and fourteen sub-processes were defined, and experts assessed their criticality levels. The business impact analysis results were then calculated using both classical logic and fuzzy logic methods, and the scores were compared. The fuzzy logic method offered a more flexible and comprehensive assessment, managing uncertainty and variability more effectively than classical logic. It proved to be more effective in optimizing business processes, especially in situations involving high levels of uncertainty. The findings indicate that the fuzzy logic method provides a more dynamic and holistic approach to improving and prioritizing business processes.

Declarations

Consent for Publication

The author has read and approved the content of this manuscript for publication.

Competing Interests

The author declares that there are no competing interests.

Funding

This study was not funded by any organization.

Authors' Contributions

There is only one author.

References

- Bingöl, E., Arslanoğlu, İ., & Altaş, İ. H. (2022, September). A Fuzzy Inference for Plate Classification. In *2022 Innovations in Intelligent Systems and Applications Conference (ASYU)* (pp. 1-5). IEEE. <https://doi.org/10.1109/ASYU56188.2022.9925415>
- Çakır, E., & Ulukan, Z. (2021). Digitalization on Aviation 4.0: Designing a Scikit-Fuzzy control system for in-flight catering customer satisfaction. In *Intelligent and Fuzzy Techniques in Aviation 4.0: Theory and Applications* (pp. 123-146). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-75067-1_6
- Doğan, M. (2018). Toplu beslenme sistemleri ve catering hizmetleri yönetimi. *Nobel Akademik Yayınları, Editör: Doğan, Murat, Basım sayısı, 1*.
- Doğan, M. (2022). Determining The Effect of Catering Companies' Attitudes Toward Customer Complaints on Customer Loyalty. *Journal of Interdisciplinary Food Studies (Disiplinlerarası Gıda Çalışmaları Dergisi)*.
- Doğan, M. (2024). Yiyecek ve İçecek Sektörü Gastronomi 4.0 Uygulamalarında Bulanık Mantık. *VIII. International West Asia Congress of Tourism Research (IWACT)*.
- Doğan, M., & Ay, M. (2020). Evaluation of customer complaints to catering services in terms of food safety. *Journal of Tourism & Gastronomy Studies, 8(4), 2387-2401*. <https://doi.org/10.21325/jotags.2020.717>
- Doğan, M., & Tekiner, İ. H. (2021). On-site and one-year monitoring of food service business risks associated with poor hygiene quality in the catering establishments for consumer protection. *Journal of Foodservice Business Research, 24(3), 274-285*. <https://doi.org/10.1080/15378020.2020.1848258>
- Duncombe, M., & Dutilh Novaes, C. (2016). Dialectic and logic in Aristotle and his tradition. *History and Philosophy of Logic, 37(1), 1-8*. <https://doi.org/10.1080/01445340.2015.1086624>
- Hurst, A. (2023). Participant observation. *Introduction to Qualitative Research Methods*.
- İkinci, M., & Tipi, T. (2021). Food supplier selection in the catering industry using the analytic hierarchy process. *Food Science and Technology, 42, e48420*. <https://doi.org/10.1590/fst.48420>
- İlbay, B., & Ay, M. (2021). Marmaris' te Faaliyet Gösteren Farklı Statüdeki Turizm İşletmeleri Mutfaklarının Fiziki Koşullarının İncelenmesi. *Türk Turizm Araştırmaları Dergisi, 5(4), 2492-2505*. <https://doi.org/10.26677/TR1010.2021.882>
- Kahraman, C., Cebeci, U., & Ruan, D. (2004). Multi-attribute comparison of catering service companies using fuzzy AHP: The case of Turkey. *International journal of production economics, 87(2), 171-184*. [https://doi.org/10.1016/S0925-5273\(03\)00099-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5273(03)00099-9)
- Kaviranjani, G., & Rangasamy, P. (2024). Designing and developing Intuitionistic Fuzzy Logic Toolbox in MATLAB: Membership and non-membership functions gallery. <https://doi.org/10.7546/nifs.2024.30.2.142-155>
- Khan, R. A., Mirza, A., & Khushnood, M. (2020). The role of total quality management practices on operational performance of the service industry. *International Journal for Quality Research, 14(2), 439-454*. <https://doi.org/10.24874/IJQR14.02-07>
- Kubat, C. (2012). Matlab Yapay Zeka ve Mühendislik Uygulamaları. Beşiz Yayınları. Birinci Baskı.
- Levitt, H. M. (2021). Qualitative generalization, not to the population but to the phenomenon: Reconceptualizing variation in qualitative research. *Qualitative Psychology, 8(1), 95*. <https://doi.org/10.1037/qap0000184>
- Lobefaro, S., Picicocchi, C., Luisi, F., Miraglia, L., Romito, N., Luneia, R., ... & Donini, L. M. (2021). Cooking techniques and nutritional quality of food: A comparison between traditional and innovative ways of cooking. *International Journal of Gastronomy and Food Science, 25, 100381*. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100381>
- Morgan, H. (2022). Conducting a qualitative document analysis. *The Qualitative Report, 27(1), 64-77*. <https://doi.org/10.46743/2160-3715/2022.5044>
- Mutlu, H., Demirçakmak, İ. L., & Doğan, M. (2022). Menu engineering in the restaurant business: A study on kitchen chefs. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*. <https://doi.org/10.21325/jotags.2022.1154>
- Nadaban, S. (2021). From classical logic to fuzzy logic and quantum logic: a general view. *International Journal of Computers communications & control, 16(1)*. <https://doi.org/10.15837/ijccc.2021.1.4125>
- Özçakmak, S., & Gül, O. (2016). Samsun 'da Catering Hizmet Sektörünün İyi Hijyen Uygulamaları Profili. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science And Technology, 4(11), 1031-1038*. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i11.1031-1038.808>

- Parker, C., Scott, S., & Geddes, A. (2019). Snowball sampling. *SAGE research methods foundations*.
- Peckol, J. K. (2021). *Introduction to fuzzy logic*. John Wiley & Sons.
- Rajaratnam, D., & Sunmola, F. (2023). Evaluation of airline catering supply chain practice effectiveness using fuzzy logic. *International Journal of Productivity and Quality Management*, 40(3), 308-339. <https://doi.org/10.1504/IJPM.2023.134811>
- Rose, J., & Johnson, C. W. (2020). Contextualizing reliability and validity in qualitative research: Toward more rigorous and trustworthy qualitative social science in leisure research. *Journal of leisure research*, 51(4), 432-451. <https://doi.org/10.1080/00222216.2020.1722042>
- Scanlon, N. L. (2012). *Catering management*. John Wiley & Sons.
- Serrano-Guerrero, J., Romero, F. P., & Olivas, J. A. (2021). Fuzzy logic applied to opinion mining: a review. *Knowledge-Based Systems*, 222, 107018. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2021.107018>
- Shadiyev, A. K. (2021). Development and organization catering service in hospitality. *ACADEMICIA: An International Multidisciplinary Research Journal*, 11(5), 381-387. <https://doi.org/10.5958/2249-7137.2021.01408.7>
- Shaikh, A., Singh, A., Walawalkar, G., & Kapasi, F. (2019). *Catering Management*.
- Silvius, A. J., & Schipper, R. P. (2014). Sustainability in project management: A literature review and impact analysis. *Social business*, 4(1), 63-96. <https://doi.org/10.1362/204440814X13948909253866>
- Tom, M., & Annaraud, K. (2021). Fuzzy based intelligent decision support model for restaurant menu management. *Intelligent Decision Technologies*, 15(3), 387-396. <https://doi.org/10.3233/IDT-200162>
- Walls, H., Baker, P., Chirwa, E., & Hawkins, B. (2019). Food security, food safety & healthy nutrition: are they compatible?. *Global Food Security*, 21, 69-71. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.05.005>
- Wong, W. N. Z. Z., & Shi, J. (2014). *Business continuity management system: A complete guide to implementing ISO 22301*. Kogan Page Publishers.
- Ying-Yen, L. (2022). Analysis of consumer behavior in catering consumption. *International Journal of Organizational Innovation (Online)*, 14(4), 110-117.
- Zadeh, L. A. (2023). Fuzzy logic. In *Granular, Fuzzy, and Soft Computing* (pp. 19-49). New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2628-3_234



Assessment of Traditional and Commercial Rosehip Marmalade Samples: Physicochemical, Antioxidant, and Antibacterial Properties in Gümüşhane Province

Fırat Yılmaz^{1,a,*}

¹Gümüşhane University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Food Engineering, 29100 Gümüşhane, Türkiye
*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 14.08.2024 Accepted : 29.09.2024</p> <p>Keywords: Antibacterial Antioxidant Marmalade Physicochemical Rosehip</p>	<p>In this study, the specific physicochemical, antioxidant, and antibacterial properties of 20 different rosehip marmalade samples, produced using traditional and commercial methods in the Gümüşhane province and its districts, were comprehensively analyzed. To detect the chemical composition of the rosehip marmalade samples, analyses were conducted for total dry matter, pH, ash, titratable acidity (malic acid %), soluble solids, water activity, and color (L^*, a^*, b^*). Additionally, alongside the physicochemical analyses, the contents of hydroxymethylfurfural (HMF) and sugars (fructose, glucose, sucrose, and total sugar) were also determined. To assess the antioxidant properties, analyses for total flavonoid content, total phenolic content, DPPH (% inhibition), and ABTS (% inhibition) were performed. Furthermore, the antibacterial activities of the rosehip marmalade samples against pathogenic bacterial strains such as <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29212, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 23566, and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 35150 were investigated.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2317-2327, 2024

Gümüşhane İli'nde Geleneksel ve Ticari Kuşburnu Marmelat Örneklerinin Fizikokimyasal, Antioksidan ve Antibakteriyel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 14.08.2024 Kabul : 29.09.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel Antioksidan Fizikokimyasal Kuşburnu Marmelat</p>	<p>Bu çalışmada, Gümüşhane ili ve ilçelerinde geleneksel ve ticari yöntemlerle üretilen 20 farklı kuşburnu marmelatı örneklerinin, belirli fizikokimyasal, antioksidan ve antibakteriyel özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kuşburnu marmelatı örneklerinin fizikokimyasal niteliklerinin belirlenmesi amacıyla, toplam kuru madde, kül, pH, titre edilebilir asitlik (Malik asit cinsinden %), suda çözünebilir kuru madde, su aktivitesi ve renk (L^*, a^*, b^*) analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, fizikokimyasal analizlerin yanı sıra örneklerin hidrokümetilfurfural (HMF) ve şeker (fruktoz, glikoz, sakkaroz ve toplam şeker) içerikleri de belirlenmiştir. Antioksidan özelliklerin değerlendirilmesi için toplam flavonoid, toplam fenolik madde miktarları, DPPH (% inhibisyon) ve ABTS (% inhibisyon) analizleri uygulanmıştır. Ek olarak; <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29212, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 23566 ve <i>Escherichia coli</i> O157:H7 35150 gibi patojen bakteri suşlarına karşı kuşburnu marmelatı örneklerinin antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır.</p>

^a asst.prof.firatyilmaz@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-3633-0012>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Fruits are essential for a healthy diet, containing various nutrients that can reduce the risk of chronic diseases. The demand for healthy fruits and vegetables is increasing, yet their limited shelf life and transportation challenges present significant obstacles to commercialisation. However, they have a high water content and limited shelf life, so methods like jam making and drying are used to preserve them, often with added sugar (Yıldız Turgut et al., 2023). Rosehip fruit, also known as dog rose, is a highly nutritious shrub plant that contains minerals, vitamins, and antioxidants. It has various applications in the food, beverage, cosmetic, and pharmaceutical industries due to its therapeutic effects (Uğuzdoğan et al., 2024). In Türkiye, organic rosehip production in 2019 was 1.001 tonnes, with a potential harvest of 8,020 tonnes. Despite its beneficial properties, only a small percentage of rosehip fruit grown in Türkiye is harvested and utilised (Uğuzdoğan et al., 2024). Rosehip is rich in vitamin C, oil, phenolic substances, and carotenoids, making it effective in treating colds, gastrointestinal disorders, infections, and diabetes. It has a wide range of application areas, including traditional medicine, where it is used to treat kidney and bladder stone disorders, diarrhoea, bleeding gums, chest pains, and knee joint arthropathy (Demir et al., 2014). Furthermore, rosehip has diuretic, laxative, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-cold properties, as well as the ability to inhibit melanin production and protect the liver. It may also offer potential health benefits and therapeutic applications by suppressing insulin-like growth factor and having an anticomplementary effect (Memiş Kocaman & Sormaz, 2023; Öz et al., 2018). Rosehip is commonly used in the production of various products, including jam, tea, and oil. It is known for its high content of vitamins and minerals (Aksu et al., 1997). The utilisation of processing techniques, such as the production of marmalade, serves to extend the shelf life of these fruits and vegetables. Furthermore, this technique is beneficial in maintaining the natural nutritional value of the foodstuff in question. Marmalades are a high-calorie foodstuff, providing a good source of energy and carbohydrates (Esin Yücel et al., 2024). Marmalade is a spread made from ripe fruit and is similar to jam, but with larger fruit pieces. The preparation of marmalade requires the use of a variety of fruits, which must be soaked and boiled prior to the application of the requisite techniques (Topdaş et al., 2018). The rosehip-based products that is rosehip marmalade widely consumed for breakfast in Türkiye. Marmalade is prepared by boiling the fruit pulp with sugar and acid until the desired brix value is reached. It is generally known that the shelf life of marmalade is approximately two years. In addition to the sensory properties of marmalade, rheological properties are among the most important factors determining consumer preference (Sagdic et al., 2015). Furthermore, the soluble dry matter content determined by refractometer in marmalade cannot be less than 55% according to Turkish Food Codex (Anonymous, 2006). Due to its botanical characteristics, rosehips are not suitable for fresh consumption as they contain a large amount of seeds and hairs. It is therefore preferable to use the pulp for processing. The processing of rosehips into marmalade

consists of two main stages: the extraction of pulp from the fresh fruit and the subsequent production of marmalade from the extracted pulp. In marmalade production, the pulp obtained is subjected to a pre-heating process. Sugar is then added and the mixture undergoes a second heat treatment to reach the desired brix level. At this point acid is added, the jars are filled and the pasteurisation stage begins. Adjusting the proportions of water, sugar and acid is of great importance in marmalade production (Özbey et al., 2017). A common practice in marmalade production is the boiling of traditionally produced marmalades at high temperatures for extended periods of time. This practice results in a reduction in the nutritional value and antioxidant activity of marmalade. Vacuum cooking and standardised quality production can be employed to address these issues. This study focuses on traditional and commercial rosehip marmalades produced in Gumushane province.

Material and Method

Material

In this study, rosehip marmalades produced traditionally and commercially in Gumushane province and its districts and sold in various markets and local markets were analysed. In this context, 10 rosehip marmalades produced by traditional method and 10 rosehip marmalades produced by commercial method were collected and the research material was formed. The rosehip marmalade samples were stored + 4°C until they were analysed in the laboratory. The analyses were designed as 2 replicates and 3 parallels.

Analyses of Physicochemical Properties

Water soluble dry matter (°Brix), pH, total dry matter, water activity (aw) (AquaLab, Series 3TE, USA), ash amount and the acidity (as % malic acid) were analysed according to the relevant method (Cemeroğlu, 2010). The L^* , a^* , and b^* colour values of the rosehip marmalade samples were measured using a Minolta CR 400 colour measuring device. Prior to the measurements, the device was calibrated with a white ceramic calibration plate, and all measurements were carried out on a white background using a liquid measuring cup. In accordance with the colour coordinate system, the L^* value serves as an indicator of whiteness and blackness, with a range of 0 (black) to 100 (white). The a^* value represents a greenness-redness indicator, with a range of -60 (green) to +60 (red). Finally, the b^* value functions as an indicator of blueness and yellowness, with a range of -60 (blue) to +60 (yellow).

Preparation of Marmalade Extracts

The extraction of the samples was conducted in accordance with the methodology outlined by (Topdaş et al., 2018), with certain modifications made to ascertain antioxidant property, antibacterial activity, total phenolic and flavanoid amount. For this purpose, 25 mL of ethanol was added to the samples, which were weighed individually at 5 g each in centrifuge tubes. The samples were subjected to an ultrasonic water (Bandelin RK 100 H, Germany) bath for 20 minutes and then stirred for 15 minutes with a mechanical shaker. Following

centrifugation (Beckman coulter Allegra XR30, Germany) at 8500 rpm for 20 minutes at 4°C in a refrigerated centrifuge, the clear supernatant was collected and stored in amber glass bottles at 20°C until further analysis.

Total Sugar and HMF (hydroxymethylfurfural) Amounts

The fructose, glucose and sucrose and hydroxymethylfurfural (HMF) contents of marmalade samples were quantified in accordance to Bogdanov et al. (2002). Fructose, glucose and sucrose contents were determined by dissolving molasses samples in deionised water and analysing them by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan). The results were calculated using the mobile phase, which was a mixture of acetonitrile and water. For the measurement of HMF, the molasses sample was dissolved in deionised water and analysed by HPLC. The amounts of HMF present in the samples were quantified using an HPLC device with a C-18 column. The chromatograms were obtained at a 284 nm wavelength using a Diode Array Detector (Shimadzu, Japan). The amount of HMF was determined using an external calibration curve.

Determination of Total Phenolic and Total Flavonoid Amount

Total phenolic and flavonoid contents of rosehip marmalade samples were measured according to Kalın et al. (2015). For this purpose, gallic acid was utilised as a reference standard substance to measure the total amount of phenolic substances in rosehip marmalade samples. A standard graph was prepared by combining the marmalade extract with gallic acid, adjusting the volume by distilled water and adding reagent (Folin-Ciocalteu) and 2% Na₂CO₃. After mixing, absorbance readings were taken at 760 nm and these values were used to determine the gallic acid equivalent (GAE) using a formula derived from the standard graph. Ethanol (99%) containing CH₃COOK and 10% Al(NO₃)₃ was also utilized to measure the total flavonoid amount in rosehip marmalade samples. 1000 µl of the extract was combined with the ethanol solution (aforementioned) and the mixture was shaken by vortex. The absorbance of the mixture was then measured at 415 nm. Quercetin content (QE) was employed as a reference standard to calculate the total flavonoid concentration.

ABTS Radical Scavenging Capacity

The radical scavenging capacity of ABTS was determined according to the method that is occurred by Re et al. (1999) and Topal et al. (2024). Initially, ABTS radical solution were formed by adding a 2.45 nM persulfate solution. The extract of rosehip marmalade sample was subjected to addition of ABTS radical solution, followed by incubation, and the absorbances against the blank at 734 nm were evaluated at various concentration.

DPPH Free Radical Scavenging Capacity

1 mM DPPH solution was used as free radical. The Prepared stock solution at a concentration of 1 mg/mL was used as a control sample. Then, the stock DPPH solution was added to each sample tube. After the incubation period, the absorbance was measured at 517 nm in comparison with the blank sample (Blois, 1958; Topal et al., 2024).

Antibacterial Activity

The selected bacterial strains were obtained from Gumushane University Central Research Laboratory and antibacterial assays were applied in the Food Engineering Laboratory. In the study, antibacterial activities of Rosehip marmalade were tested by disc diffusion method (Matuschek et al., 2014; Topal et al., 2024). The following bacterial strains were employed in this study: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 23566 and *Escherichia coli* O157:H7 35150. These were used to assess the antibacterial properties of traditional and commercial rosehip marmalades. Twenty microlitres of the extract was placed on sterile disc papers over Nutrient agar and the petri dishes were left to incubate at 36 °C for 24 hours. At the end of the incubation period, the zone areas formed around the disc papers were measured.

Statistical Analysis

The statistical data of this study were analysed using SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). ANOVA (One-way ANOVA) analysis was applied to the raw values obtained and the averages of the data were calculated at P<0.05 significance level.

Results and Discussion

Rosehip Marmalades of Physicochemical Properties

The results of the analyses of total dry matter, water-soluble dry matter (Brix), ash, titration acidity, pH, and water activity of rosehip marmalades produced by traditional and commercial methods, collected from the Gumushane province and districts, are presented in Table 1. The total dry matter ratios of the rosehip marmalade samples exhibited considerable variation, with values ranging from 23.28% to 60.22%. It was observed that the highest and lowest total dry matter ratios were present in the rosehip marmalades produced through the traditional method. The mean total dry matter content of traditional rosehip marmalades (41.00%) was found to be significantly lower than that of commercial rosehip marmalades (49.61%), with the mean total dry matter content of the sample groups exhibiting a statistically significant difference (P<0.05). Özbey et al. (2017), Özdemir et al. (1997), and Aksu et al. (1997) reported that the total dry matter ratios of rosehip marmalade samples varied between 36.45-67.72%, 52.00-66.40% and 33.00-50.00%, respectively. Topdaş et al. (2018) and Arslaner & Salık (2020) reported that the average total dry matter ratios of rosehip marmalade samples were 56.45% and 59.71% (respectively) and these ratios were higher than the average total dry matter ratio obtained in the present study. The ash ratios of rosehip marmalades were found to exhibit a range of values between 0.51 and 1.39%. It was observed that the mean ash ratio of commercial rosehip marmalades (0.85%) was higher than that of traditional rosehip marmalades (0.83%), although the mean ash ratios of the sample groups were not statistically different (P>0.05). It was stated that ash ratios of rosehip marmalade samples produced by applying different methods varied between 0.20% and 0.25% and there was no statistical difference between sample groups (Yıldız & Alpaslan, 2012).

Table 1. Physicochemical properties of rosehip marmalade samples

Sample	Total Solid Matter (%)		Ash (%)		Titratable Acidity (%Malic acid)	
	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	47.66±0.07	52.06±0.01	0.96±0.01	0.58±0.01	1.06±0.04	0.81±0.04
2	37.97±0.02	31.44±0.03	1.15±0.02	1.07±0.02	1.87±0.04	1.70±0.04
3	23.28±0.02	52.92±0.05	0.87±0.01	1.11±0.03	1.24±0.00	1.51±0.00
4	49.11±0.10	44.22±0.03	0.75±0.01	0.86±0.02	1.42±0.01	0.80±0.08
5	60.22±0.01	53.80±0.01	0.65±0.02	0.74±0.02	1.40±0.02	1.55±0.04
6	39.19±0.08	51.10±0.00	0.74±0.01	0.69±0.00	1.60±0.01	0.94±0.04
7	51.52±0.02	56.28±0.03	0.51±0.01	0.91±0.01	1.45±0.01	1.57±0.00
8	35.88±0.10	53.58±0.01	0.80±0.01	0.75±0.00	1.53±0.01	1.52±0.13
9	30.97±0.03	46.91±0.02	0.96±0.02	0.83±0.01	1.50±0.02	1.21±0.04
10	34.22±0.04	53.74±0.07	1.39±0.01	0.96±0.01	1.39±0.04	1.31±0.04
Mean	41.00±1.94 ^a	49.61±1.29 ^b	0.83±0.03 ^a	0.85±0.03 ^a	1.45±0.04 ^a	1.29±0.06 ^b
ANOVA (P)	0.000		0.688		0.038	
Min	23.28		0.51		0.80	
Max	60.22		1.39		1.87	
Sample	pH		Water-soluble dry matter (°Brix)		Water Activity (aw)	
	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	3.23±0.02	4.12±0.01	48.75±0.00	50.00±0.00	0.85±0.00	0.86±0.00
2	3.32±0.01	3.06±0.01	38.75±0.00	31.25±0.00	0.87±0.00	0.88±0.00
3	3.55±0.01	3.31±0.00	23.33±0.42	51.25±0.00	0.89±0.00	0.84±0.00
4	2.96±0.01	3.76±0.01	53.75±0.00	42.50±0.72	0.83±0.00	0.87±0.00
5	3.05±0.00	3.76±0.01	59.58±0.83	52.08±0.42	0.76±0.00	0.81±0.00
6	3.09±0.01	3.84±0.01	40.00±0.72	49.58±0.42	0.87±0.00	0.85±0.00
7	3.01±0.01	3.26±0.01	53.33±0.83	52.92±0.42	0.82±0.00	0.79±0.00
8	3.21±0.01	3.18±0.01	32.92±1.10	52.08±0.42	0.87±0.00	0.81±0.00
9	3.96±0.01	3.13±0.01	31.67±1.10	47.08±0.42	0.88±0.00	0.85±0.00
10	3.55±0.01	3.35±0.01	33.33±0.83	51.25±0.00	0.88±0.00	0.83±0.00
Mean	3.29±0.06 ^a	3.48±0.06 ^b	41.54±2.08 ^a	48.00±1.17 ^b	0.85±0.01 ^a	0.84±0.00 ^a
ANOVA (P)	0.031		0.009		0.110	
Min	2.96		23.33		0.76	
Max	4.12		59.58		0.89	

^{a,b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at P < 0.05 level.

Özbey et al. (2017) reported that the total ash values of rosehip marmalade samples varied between 0.659% and 1.430%, and the average ash rate was determined to be 0.935%. In titration acidity analyses, the highest titration acidity value (1.87%) was determined in traditional rosehip marmalades, while the lowest titration acidity value (0.80%) was determined in commercial rosehip marmalade samples. Upon analysis of the mean titration acidity values, it was observed that traditional rosehip marmalades exhibited higher titration acidity values (1.45%) than commercial rosehip marmalades. These results indicate a statistically significant difference among the mean titration acidity values of the rosehip marmalade samples (P<0.05). Vural (2023) observed that samples of rosehip marmalade produced using the traditional method exhibited higher acidity levels (0.91%) than those produced using the industrial method. Nevertheless, no statistically significant discrepancy was identified in acidity values between the sample groups. In a study investigating the quality characteristics of traditional wild fruit marmalades, the total acidity values of marmalade samples exhibited a range between 0.62% and 3.40%. The sample of rosehip marmalade demonstrated an acidity value of 1.05% (Arslaner & Salık, 2020). In addition, it was determined that the acidity values of rosehip marmalade samples

produced by adding commercial sugar at different ratios to rosehip pulps varied between 0.40-1.31% at the beginning of storage and at the end of the five-month storage period, the acidity values were between 0.42% and 1.25% (Aksu et al., 1997). The significance of pH for optimal gel formation in products such as jam and marmalade is underscored. In this regard, the Turkish Food Codex states that the pH value should be within the range from 2.8 to 3.5 (Anonymous, 2006). In this context, it was determined that 70% of traditional rosehip marmalades and 60% of commercial rosehip marmalades were within the pH range specified in the Turkish Food Codex. Furthermore, the pH values of the sampled traditional and commercial rosehip marmalades exhibited a range from 2.96 to 4.12. The mean pH value of traditional rosehip marmalade samples (3.29) was found to be lower than that of commercial rosehip marmalades (3.48). A statistically significant difference (P<0.05) was observed between the mean pH values of the sample groups. Vural (2023) found that the pH value of traditional rosehip marmalade samples (4.01) was markedly higher than that of industrial rosehip marmalade samples, with a statistically significant discrepancy between the mean pH values of the two sample groups. These findings are largely in accordance with the pH values obtained in the present study. Furthermore, the pH

values of rosehip marmalade samples have been observed to vary considerably across different studies. For instance, the pH levels of rosehip marmalade samples ranged from 2.8 to 3.5 in a study conducted by Yıldız & Alpaslan (2012), and from 3.25 to 3.37 in another study by Özdemir et al. (1997). Additionally, the pH level of rosehip marmalade sample was reported as 3.64 in another research conducted by Arslaner & Salık (2020). The data demonstrate the considerable diversity in pH values observed among rosehip marmalade samples. It can be posited that this diversity may be significantly influenced by the production methods employed, the geographical origin of the fruit, and the specific fruit variety utilized. According to the Turkish Food Codex (Anonymous, 2006), the water-soluble dry matter (Brix) value determined by refractometry must be greater than 55%. In the present study, the °Brix values of the rosehip marmalade samples ranged from 23.33 to 59.88. It was found that 10% of the traditional rosehip marmalade complied the °Brix limit specified in the Turkish Food Codex, whereas none of the commercial rosehip marmalade complied this limit.

The mean Brix value of traditional rosehip marmalade (41.54) was found to be lower than that of commercial rosehip marmalade (48.00), with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The difference between the mean Brix values of the sample groups was considered statistically significant. Özbey et al. (2017) observed a range of °Brix values for rosehip marmalades from 41.00 to 82.00. This finding supports the view that the °Brix values found in this study are higher. Conversely, Vural (2023) reported that the °Brix values of rosehip marmalades produced by the traditional method varied between 33.7 and 35.6, with an average °Brix value of 34.8. Furthermore, Vural (2023) reported that the °Brix values of marmalade produced by the industrial method were significantly higher than those produced by the traditional method. These results are consistent with the differences in °Brix observed in the present study.

Water activity levels in rosehip marmalade samples ranged from 0.76 to 0.89. The mean water activity level of traditional rosehip marmalades (0.85) was found to be significantly higher than that of commercial rosehip marmalades (0.84). Nevertheless, the difference among the

mean water activity values of the sample groups was minimal, and a general similarity among these values was observed ($P > 0.05$). The water activity values of different types of marmalade were reported to range from 0.924 to 0.932 by Cingöz & Demirdöven (2022) and from 0.84 to 0.89 by Kaya et al. (2016). Also, Arslaner & Salık (2020) indicated that the water activity values in various marmalade samples ranged from 0.818 to 0.894, with rosehip marmalade having a water activity value of 0.885. Özbey et al. (2017) reported that the water activity (a_w) levels in rosehip marmalades exhibited a range from 0.804 to 0.904, and the mean water activity value was 0.881. Topdaş et al. (2018) reported that the a_w value in rosehip marmalade samples ranged from 0.79 to 0.90. The colour values in rosehip marmalade samples are presented in Table 2. The L^* colour value is considered a quality parameter as it reflects the degree of lightness or darkness of the product. The L^* values of the rosehip marmalades exhibited a range from 27.79 to 14.52. The mean L^* value was 20.03 for traditional rosehip marmalades and 22.31 for commercial rosehip marmalades. There are significant difference between the mean L^* values of traditional and commercial rosehip marmalade samples. The a^* values of the rosehip marmalades varied between 20.10 and 10.48. The mean a^* values were 13.62 for traditional rosehip marmalades and 14.49 for commercial rosehip marmalades. The a^* values exhibited no statistically significant differences among marmalade sample groups. The b^* values in rosehip marmalades exhibited from 23.90 to -1.49. The mean b^* value was found to be 6.03 in traditional rosehip marmalades and 9.24 in commercial rosehip marmalades. The statistical analyses revealed a significant difference between the mean b^* values of traditional and commercial rosehip marmalades. Arslaner & Salık (2020) and Topdaş et al. (2018) determined the L^* , a^* , b^* colour values of rosehip marmalades as 34.34-33.70, 20.86-23.59, 14.22-5.76, respectively. Özbey et al. (2017) reported the average L^* , a^* , b^* values of rosehip marmalades as 30.89, 10.90, 15.11, respectively. The findings that is our study revealed that L^* and b^* levels were lower to compared to previous studies. Kaya et al. (2016) reported that the L^* , a^* , b^* colour levels in rosehip marmalade samples were 34.44, 10.63, 18.00, respectively.

Table 2. Color values of rosehip marmalade samples

Sample	L^*		a^*		b^*	
	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	21.83±0.03	24.84±0.01	15.34±0.02	12.48±0.02	7.39±1.03	12.22±0.04
2	19.34±0.01	27.79±0.02	14.77±0.02	20.10±0.01	5.70±0.04	19.11±0.05
3	31.51±0.01	19.50±0.03	17.76±0.01	12.97±0.07	23.90±0.00	5.15±0.07
4	19.15±0.01	23.28±0.04	12.89±0.03	15.54±0.03	4.14±0.03	12.34±0.05
5	17.75±0.01	22.18±0.01	10.68±0.08	15.23±0.03	0.36±0.03	9.70±0.04
6	14.52±0.01	22.92±0.01	10.48±0.02	14.90±0.01	-1.46±0.02	10.51±0.03
7	16.91±0.01	17.82±0.01	11.21±0.04	11.46±0.02	0.67±0.04	1.05±0.01
8	19.84±0.01	22.23±0.00	14.62±0.08	15.10±0.01	6.37±0.03	9.20±0.04
9	19.89±0.01	22.25±0.01	14.31±0.02	13.37±0.05	6.98±0.04	6.58±0.19
10	19.55±0.00	20.27±0.02	14.18±0.03	13.76±0.08	6.21±0.02	6.50±0.07
Mean	20.03±0.79 ^a	22.31±0.49 ^b	13.62±0.41 ^a	14.49±0.42 ^a	6.03±1.24 ^a	9.24±0.86 ^b
ANOVA (P)	0.018		0.143		0.038	
Min	14.52		10.48		-1.46	
Max	27.79		20.10		23.90	

^{a-b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at $P < 0.05$ level.

Table 3. HMF amounts of rosehip marmalade samples

Rosehip Marmalade Samples	HMF (mg/kg)	
	Traditional	Commercial
1	N.D	N.D
2	7.56±1.47	N.D
3	5.39±0.31	N.D
4	4.19±0.00	N.D
5	9.25±1.14	N.D
6	3.92±0.03	N.D
7	9.33±0.25	N.D
8	4.37±0.16	N.D
9	N.D	N.D
10	N.D	N.D
Mean	4.40±0.65 ^b	N.D
ANOVA (P)		0.000
Min		N.D
Max		9.33

^{a,b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at P < 0.05 level. N.D: Not detected

Table 4. Sugar amounts of rosehip marmalade samples

RMS	Fructose (mg/kg)		Glucose (mg/kg)		Sucrose (mg/kg)		Total sugar (mg/kg)	
	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	19.02±0.02	11.78±0.15	18.70±0.04	13.58±0.07	46.38±0.02	72.18±0.16	84.11±0.01	92.55±0.12
2	11.40±0.00	11.67±0.17	5.44±0.00	13.18±0.19	33.17±0.00	21.89±0.20	50.02±0.00	46.76±0.41
3	7.18±0.00	13.23±0.09	7.70±0.00	16.25±0.02	15.13±0.00	40.05±0.21	30.01±0.00	69.55±0.49
4	33.83±0.13	19.31±0.01	35.96±0.13	24.51±0.34	19.68±0.01	41.65±0.34	89.48±0.01	85.48±1.21
5	48.81±0.11	18.94±3.39	54.32±0.20	28.63±5.71	12.10±0.03	19.86±3.80	115.23±0.09	67.43±2.37
6	21.11±0.15	0.58±0.25	21.29±0.37	0.58±0.30	25.67±0.12	1.65±0.77	68.06±0.59	2.82±0.29
7	38.46±0.23	31.00±2.07	41.62±0.03	38.13±1.18	8.93±0.22	2.47±0.31	89.01±0.84	71.60±1.19
8	22.90±0.02	14.66±0.26	24.41±0.08	18.29±0.40	9.87±0.24	11.53±0.07	57.17±0.51	44.48±1.29
9	13.20±0.01	17.60±0.18	14.65±0.17	22.35±0.27	17.87±0.03	44.85±0.17	45.72±0.33	84.80±0.45
10	9.40±0.47	14.41±0.29	9.97±0.85	17.56±0.72	12.90±0.80	36.89±1.23	32.26±0.67	68.87±3.90
Mean	22.53±2.42 ^b	15.32±1.39 ^a	23.40±2.81 ^a	19.31±1.84 ^a	20.17±2.09 ^a	29.30±3.88 ^b	66.11±0.92 ^a	63.93±0.89 ^a
A		0.012		0.228		0.043		0.755
Min		0.58		0.58		1.65		2.82
Max		48.81		54.32		72.18		115.23

RMS: Rosehip Marmalade Samples; A: ANOVA (P); ^{a,b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at P < 0.05 level.

HMF and Sugar Amount of Rosehip Marmalade

In products such as jams and marmalades, browning occurs as a result of the reaction of reducing sugars with amino acids. This process is accelerated by increasing the temperature and duration of the heat treatment applied. This non-enzymatic browning process, known as the Maillard reaction, results in the formation of intermediates, including HMF. HMF is formed both by the heat treatment of food and by the breakdown of sugars in an acidic environment, contributing to the formation of brown pigments (Başkaya Sezer et al., 2016; Duru et al., 2012; Yolcu Ömeroğlu & Acoğlu, 2020). The amounts of HMF detected in the rosehip marmalade samples are shown in Table 3. The amount of HMF was only detected in traditional rosehip marmalades; the average amount of HMF in traditional rosehip marmalades was determined to be 4.40 mg/kg (P<0.001). The results of our study are supported by the findings of Vural (2023), who reported that the amount of HMF was higher in rosehip marmalade produced by the traditional method than in those produced by the industrial method. Similarly, the HMF amount in marmalade samples determined by Başkaya Sezer et al. (2016) (0.389 mg/100g = 3.89 mg/kg) is in agreement with

our results. Conversely, the study by Yolcu Ömeroğlu & Acoğlu (2020) did not identify the presence of HMF in marmalade samples. Yıldız & Alpaslan (2012) observed that the quantity of HMF present in rosehip marmalades produced via disparate methodologies exhibited a range of 3.86-32.64 mg/kg. Furthermore, the studies formed by Yıldız & Alpaslan (2012), Arslaner & Salık (2020), and Topdaş et al. (2018) have determined the HMF amounts in marmalade samples to be 0.22-11.80 mg/kg, 5.81-53.40 mg/kg, and 10.95-1094.11 mg/kg, respectively. The sugar contents of rosehip marmalade samples are presented in Table 4. The highest fructose amount (48.81 mg/kg) was determined in traditional rosehip marmalade, while the lowest fructose amount (0.58 mg/kg) was determined in commercial rosehip marmalade. The mean fructose amount in traditional rosehip marmalade (22.53 mg/kg) was significantly higher than commercial rosehip marmalade (15.32 mg/kg) (P<0.05). The glucose amount in rosehip marmalade samples was evaluated, and it was found that the highest glucose level (54.32 mg/kg) was present in traditional rosehip marmalade, while the lowest glucose level (0.58 mg/kg) was present in commercial rosehip marmalade. It was observed that the mean glucose

amount in traditional rosehip marmalades was significantly higher than commercial rosehip marmalades. Nevertheless, no statistically significant change was observed in terms of mean glucose content in rosehip marmalade sample groups ($P>0.05$). The sucrose amount in rosehip marmalade samples was analysed, and it was observed that the highest sucrose amount (72.18 mg/kg) and the lowest sucrose amount (1.65 mg/kg) were present in commercial rosehip marmalade samples. The results of the analysis demonstrated that the mean sucrose content of commercial rosehip marmalade samples was markedly higher than that of traditional rosehip marmalade samples ($P<0.05$). The total sugar content of the samples of rosehip marmalade was analysed, and it was determined that the highest total sugar content was present in the traditional rosehip marmalade, while the lowest total sugar content was present in the commercial rosehip marmalade. The results of the analyses demonstrate that the mean total sugar content of the traditional rosehip marmalade samples is greater than that of the commercial rosehip marmalade samples. However, no statistically significant discrepancy was identified among the mean total sugar contents of marmalade sample groups ($P>0.05$). Yıldız Turgut et al. (2023) determined the amounts of fructose, glucose, sucrose and total sugar to be 0.78-10.99, 0.56-7.43, 35.59-48.10, 36.82-66.59 mg/kg, respectively.

Total flavonoid and phenolic

The total flavonoid and phenolic substance contents in rosehip marmalade samples are presented in Table 5. The results of the analysis demonstrated that the total flavonoid content of the rosehip marmalade samples exhibited considerable variability, with values ranging between 259.44 and 669.64 $\mu\text{g QE/g}$. Nevertheless, the mean total flavonoid content of traditional rosehip marmalade samples was markedly higher than that of commercial rosehip marmalades ($P<0.05$). Vural (2023) reported that the average total flavonoid content of rosehip marmalade samples produced by traditional methods was significantly higher than that of rosehip marmalade samples prepared by industrial production methods. It was also emphasised that the difference between them was statistically significant. On the other hand, Uçan Türkmen et al. (2019) reported that there was no statistically significant difference

between the total flavonoid contents of fruit pulp mixtures. The total phenolic content of rosehip marmalade samples varied between 567.78-2104.44 $\mu\text{g GAE/g}$. In this range, the highest and lowest phenolic matter levels were found in traditional rosehip marmalade samples. On the other hand, it was observed that commercial rosehip marmalade samples contained higher total phenolic substances on average. The mean total phenolic content of traditional and commercial rosehip marmalade samples was not found to be statistically significant ($P>0.05$). Kaya et al. (2016) found no statistically significant difference in the mean total phenolic content between traditional and commercial rosehip marmalade samples. The total phenolic content reported by Kaya et al. (2016) was 913.46 $\mu\text{g GAE/g}$. Bulut (2019) reported a range from 1047.60 to 1137.56 $\mu\text{g GAE/g}$ for the total phenolic content in rosehip marmalade samples. Yıldız & Alpaslan (2012) found a statistically significant difference in the total phenolic content between rosehip marmalade samples produced by different methods. Esin Yücel et al. (2024) reported a range from 59.62 to 111.85 $\mu\text{g GAE/g}$ for the total phenolic content in marmalade samples, with an average of 72.7585 $\mu\text{g GAE/g}$. Topuz et al. (2019) determined the total phenolic content in rosehip marmalade samples was 1054.6 $\mu\text{g GAE/g}$. Topdaş et al. (2018) emphasized that there were significant differences in total phenolic content between different marmalade samples, with rosehip marmalade having the highest total phenolic content. Additionally, Başkaya Sezer et al. (2016), Uçan Türkmen et al. (2019), and Kaplan & Okcu (2020) found statistically significant differences in the average total phenolic content of marmalade samples.

DPPH and ABTS Radical Scavenging Capacity

The antioxidant capacities of rosehip marmalade samples were calculated as DPPH and ABTS free radical removal percentage inhibition and the results of these samples are presented in Table 6. BHA, BHT, Tocopherol and Trolox were used as standard antioxidants in the determination of antioxidant capacity. In the analyses, the lowest DPPH inhibition rate was found in traditional rosehip marmalade samples and the highest DPPH inhibition rate was found in commercial rosehip marmalade samples.

Table 5. Total flavanoid and phenolic matter amounts of rosehip marmalade samples

Rosehip Marmalade Samples	Total Flavonoid ($\mu\text{g QE/g}$)		Total Phenolic ($\mu\text{g GAE/g}$)	
	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	525.82±2.60	259.44±3.57	1545.56±1.89	1267.78±1.11
2	610.05±1.33	669.64±0.00	1524.44±5.87	2018.89±1.11
3	518.75±2.95	504.17±2.75	2104.44±5.56	892.22±1.11
4	384.67±9.01	343.90±2.70	567.78±1.11	1506.67±3.33
5	581.69±6.40	519.86±2.19	945.56±1.11	1001.11±7.78
6	562.87±4.73	322.09±2.51	852.22±2.93	1151.11±2.94
7	435.57±3.04	428.50±2.65	656.67±1.92	820.00±1.93
8	665.63±4.01	494.49±3.01	1381.11±4.44	1545.56±2.93
9	667.63±2.01	511.91±2.90	1454.44±2.22	1247.78±2.94
10	649.70±1.99	522.47±3.43	1485.56±4.84	1208.89±2.94
Mean	560.23±1.87 ^b	457.65±2.24 ^a	1251.78±8.46 ^a	1266.00±6.24 ^a
ANOVA (P)		0.001		0.893
Min		259.44		567.78
Max		669.64		2104.44

^{a,b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at $P < 0.05$ level.

Table 6. Antioxidant capacity of rosehip marmalade samples

Standard	DPPH (% scavenging)		ABTS (% scavenging)	
BHA	84.47±0.51		98.87±0.08	
BHT	43.11±1.70		98.84±0.03	
Tokoferol	75.89±0.38		98.93±0.06	
Trolox	95.98±0.04		98.96±0.03	
Sample	Traditional	Commercial	Traditional	Commercial
1	73.47±0.90	70.96±2.09	99.05±0.03	98.84±0.03
2	70.04±1.27	92.49±0.80	99.14±0.03	99.02±0.03
3	92.24±0.25	46.00±1.38	99.17±0.00	97.46±0.06
4	25.00±0.39	80.31±3.05	70.09±1.73	98.93±0.06
5	49.98±3.00	78.49±2.05	98.50±0.17	98.69±0.18
6	43.16±0.82	62.24±3.61	96.51±0.79	98.99±0.05
7	34.51±4.24	39.98±1.42	72.23±3.46	92.81±2.77
8	69.16±1.12	76.42±1.60	98.93±0.11	99.05±0.06
9	73.09±2.27	65.29±1.19	99.05±0.61	98.93±0.11
10	71.80±1.57	57.53±1.39	99.14±0.03	99.08±0.00
Mean	60.24±3.74 ^a	66.97±2.89 ^a	93.18±2.08 ^a	98.18±0.41 ^b
ANOVA (P)	0.051		0.000	
Min	25.00		70.09	
Max	92.49		99.17	

^{a,b}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at $P < 0.05$ level.

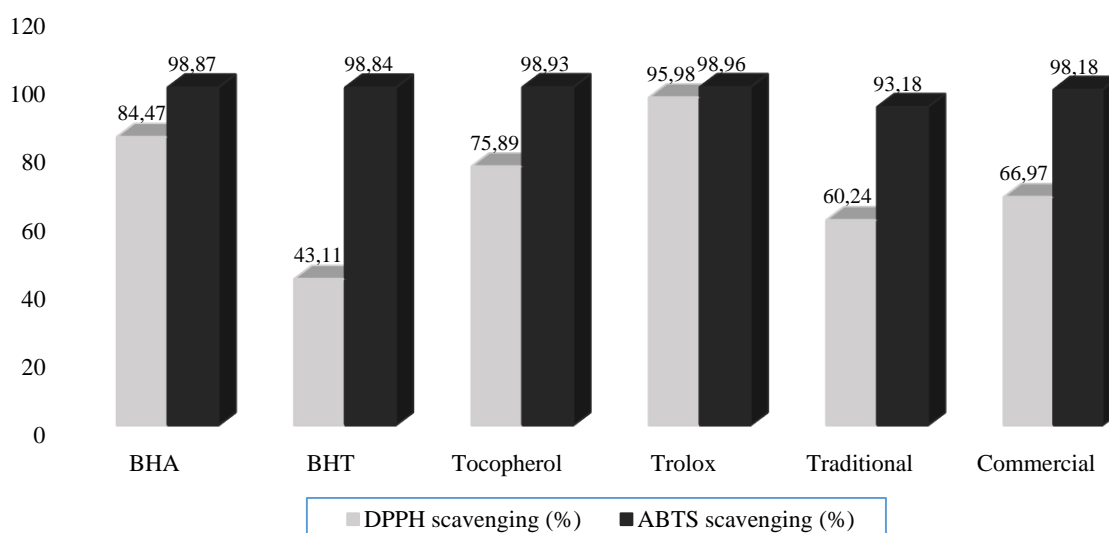


Figure 1. Comparison of the average antioxidant capacity of rosehip marmalade samples with standard antioxidant substances

However, it was observed that the average DPPH removal rate of commercial rosehip marmalade samples was higher than that of traditional rosehip marmalade samples. However, the DPPH removal rates among the two sample groups were not found to be statistically significant. Topdaş et al. (2018) obtained results at lower levels of DPPH free radical scavenging according to presented the study. Vural (2023) revealed that the DPPH free radical scavenging capacity of rosehip marmalade samples produced by traditional methods was significantly higher than the samples produced by commercial methods. Suna et al. (2023) stated that DPPH capacity in low-calorie marmalade samples varied between 34.07% and 65.18%. The analysis of ABTS removal rates in rosehip marmalade samples revealed that the lowest (70.09%) and highest (99.17%) removal rates were observed in traditional rosehip marmalade samples. Nevertheless, it was

established that the ABTS removal rates of commercial rosehip marmalade samples were superior to those of traditional samples, with a statistically significant discrepancy between the two groups. This finding is consistent with the study conducted by Başkaya Sezer et al. (2016), which revealed differences in ABTS capacity in different marmalade varieties, thus supporting the results of our study. A comparison of the mean DPPH and ABTS scavenging rates of rosehip marmalade samples with standard antioxidants is presented in Figure 1. It was found that the DPPH scavenging rates in traditional and commercial rosehip marmalade samples to compare the standard antioxidants ($P < 0.05$). On the other hand, the ABTS scavenging rates of rosehip marmalade samples were found to be almost equivalent to those of standard antioxidants and there was no statistically significant difference among them.

Table 7. Inhibition zone diameter of rosehip marmalade samples against selected pathogenic bacteria stain

RM	Bacteria Strain	Inhibition Zone Diameter (mm)					MS	Anova (p)
		1	2	3	4	5		
T	<i>Enterococcus faecalis</i>	12.33±0.20	13.13±0.73	13.57±0.05	13.60±0.50	13.77±1.01	13.47±0.15 ^A	0.151
C	ATCC 29212	14.20±0.98	13.30±0.80	14.47±0.96	13.47±1.82	10.97±0.61	12.88±0.37 ^A	
T	<i>Proteus vulgaris</i>	13.10±0.40	11.63±0.71	15.20±1.22	13.20±1.55	13.60±0.66	13.57±0.26 ^B	0.039
C	ATCC 13315	13.80±0.28	12.47±0.48	13.33±0.35	12.73±0.48	13.80±0.52	12.78±0.25 ^A	
T	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.60±0.79	13.87±0.50	12.83±0.77	14.17±0.89	14.30±1.32	13.65±0.23 ^B	0.012
C	ATCC 13883	15.20±0.20	14.07±0.20	13.23±0.43	13.23±0.12	12.17±0.99	12.67±0.30 ^A	
T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.50±0.85	13.27±0.54	13.13±0.53	13.53±0.52	15.20±0.63	13.47±0.21 ^B	0.008
C	ATCC 27853	13.57±0.77	12.80±0.10	14.33±0.28	13.30±0.60	10.70±0.00	12.53±0.26 ^A	
T	<i>Staphylococcus aureus</i>	13.17±0.17	12.67±0.17	12.67±0.34	14.90±1.27	15.30±0.75	13.61±0.23 ^A	0.398
C	ATCC 25923	14.90±0.89	13.23±0.43	14.07±0.20	14.70±1.41	13.13±0.88	13.31±0.26 ^A	
T	<i>Salmonella typhimurium</i>	13.93±0.57	12.10±0.58	15.33±0.54	14.63±0.86	13.70±0.40	13.77±0.26 ^A	0.059
C	ATCC 23566	13.07±0.08	13.37±0.55	14.60±0.45	13.70±0.40	10.90±0.57	12.99±0.30 ^A	
T	<i>Escherichia coli</i>	13.33±0.03	12.33±0.67	15.57±0.38	15.43±0.87	15.17±0.55	14.04±0.25 ^B	0.000
C	O157:H7 35150	14.43±0.66	14.57±0.26	13.60±0.49	13.43±0.78	10.40±0.80	12.56±0.30 ^A	
RM	Bacteria Strain	Inhibition Zone Diameter (mm)					MS	Anova (p)
		6	7	8	9	10		
T	<i>Enterococcus faecalis</i>	14.07±0.03	13.60±0.45	13.87±0.43	13.73±0.23	13.10±0.34	13.47±0.15 ^A	0.151
C	ATCC 29212	11.57±0.72	12.13±0.77	13.00±0.50	12.13±0.40	13.57±0.85	12.88±0.37 ^A	
T	<i>Proteus vulgaris</i>	13.10±0.15	14.00±0.63	14.57±0.68	13.27±0.43	14.07±0.43	13.57±0.26 ^B	0.039
C	ATCC 13315	11.63±0.33	14.23±1.31	12.63±0.41	10.90±0.40	12.60±0.75	12.78±0.25 ^A	
T	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.57±0.43	13.67±0.38	15.50±0.41	13.70±0.12	13.27±0.43	13.65±0.23 ^B	0.012
C	ATCC 13883	12.70±0.70	12.83±0.46	11.93±0.27	9.57±0.24	11.73±0.33	12.67±0.30 ^A	
T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.67±0.29	13.30±0.65	13.87±0.91	12.50±0.66	13.77±0.42	13.47±0.21 ^B	0.008
C	ATCC 27853	12.60±0.89	11.90±0.27	13.40±0.10	12.73±0.53	9.97±0.27	12.53±0.26 ^A	
T	<i>Staphylococcus aureus</i>	13.67±0.37	13.93±0.62	12.07±0.33	14.20±0.61	13.53±0.30	13.61±0.23 ^A	0.398
C	ATCC 25923	12.13±0.23	12.57±0.77	12.67±0.74	12.47±0.48	13.27±0.40	13.31±0.26 ^A	
T	<i>Salmonella typhimurium</i>	14.00±0.51	14.20±0.60	13.47±0.69	13.33±0.34	13.03±0.22	13.77±0.26 ^A	0.059
C	ATCC 23566	10.87±0.87	14.57±1.33	14.03±0.03	11.50±0.66	13.33±0.64	12.99±0.30 ^A	
T	<i>Escherichia coli</i>	13.83±0.94	14.50±0.20	13.10±0.60	14.43±0.24	12.73±0.23	14.04±0.25 ^B	0.000
C	O157:H7 35150	11.87±0.58	11.97±0.19	11.30±0.60	11.40±0.26	12.60±0.30	12.56±0.30 ^A	

RM: Rosehip Marmalade; T: Traditional; C: Commercial; MS: Means of Sample; ^{A-B}: Averages shown with exponential letters in the same column differ from each other at P < 0.05 level.

Antibacterial Properties of Rosehip Marmalade Samples

Inhibition zone diameters of rosehip marmalade samples for antibacterial activity against selected pathogenic bacterial strains are shown in detail in Table 7. The data clearly show that rosehip marmalade samples produced by the traditional method formed wider zones of inhibition against selected pathogenic bacterial strains compared to commercial rosehip marmalade. It was found that the inhibitory effect of traditional rosehip jam against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella typhimurium* ATCC 23566 strains was significantly stronger than that of commercial jam samples. However, it was concluded that the antibacterial activity of both groups of jams against these pathogenic bacteria was statistically similar. Çiftci & Tastekin (2023) investigated the antibacterial activity of rosehip fruit against *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains and the results showed that rosehip fruit formed the highest inhibition zone especially against *Enterococcus faecalis* strain. This finding is consistent with the data obtained in our present study and shows parallel results. Other studies in the literature also support that rosehip powder has significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and

Klebsiella pneumoniae Ghendov-Mosanu et al. (2020). Statistical analyses revealed statistically significant differences between the mean antibacterial effects of traditional and commercial rosehip jams. In particular, when the inhibition zone diameters against *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* O157 35150 strains were examined, it was clear that the traditional rosehip jam samples were significantly more efficient against these pathogens (P<0.05). Overall, it has been determined that traditional rosehip marmalade samples exhibit higher antibacterial activity compared to commercially rosehip marmalade samples, with this activity showing a marked superiority particularly against various pathogenic bacteria.

Conclusion

In this study, it has been determined that rosehip marmalade samples produced in Gumushane province and its surroundings using traditional methods or industrial processes exhibit significant differences in the analyzed properties. These differences are attributed to a variety of factors, including the genetic characteristics of the rosehip fruit, geographical conditions, variety, harvest time, and ripening stage, as well as the production methods used in

marmalade and pulp processing, pulp/sugar ratios, thermal processing conditions / time, and storage duration of rosehip products.

Declarations

Author Contribution Statement

Fırat YILMAZ: Sample collection, design, laboratory work, and writing the original manuscript

Acknowledgements

The author thanks Dr. Fevzi TOPAL, for his contribution to the antioxidant measurements.

References

- Aksu, M. İ., Özdemir, F., & Nas, S. (1997). The quality characteristics of marmalades produced at different sugar/pulp ratios by using rose hips (*rosa spp*) pulp obtained by application of preheating during process. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 3(1), 243-248. <https://dx.doi.org/>
- Anonymous. (2006). Türk Gıda Kodeksi Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği. *Resmi Gazete, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı*, 2006/55(26392). <https://www.mevzuat.gov.tr/File/GeneratePdf?mevzuatNo=10942&mevzuatTur=Tebliğ&mevzuatTertip=5>
- Arslaner, A., & Salık, M. A. (2020). Some quality properties, mineral and heavy metal composition of wild fruit traditional marmalades. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(3), 678-687. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i3.678-687.3190>
- Başkaya Sezer, D., Demirdöven, A., & Erdoğan Tokatlı, K. (2016). Çakal eriği ve yonuz eriği marmelatları. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 33(1), 125-131. <https://doi.org/10.13002/jafag899>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bogdanov, S., Martin, P., & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*, 5(1).
- Bulut, H. (2019). Farklı ısıtma sürelerinin kuşburnu pulpu ve konsantresinin özelliklerine etkisi. *Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat*.
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda Analizleri Genişletilmiş 2. Baskı. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:34, Bizim Grup Basımevi, Ankara*.
- Cingöz, A., & Demirdöven, A. (2022). Diyabetik bal kabağı (cucurbita moschata duch.) marmelatı üretimi [Production of Diabetic Pumpkin (Cucurbita moschata Duch.) Marmalade]. *Turkish Journal of Agricultural Engineering Research*, 3(1), 146-156. <https://doi.org/10.46592/turkager.1077320>
- Çiftci, G., & Tastekin, B. (2023). Antioxidant capacity and antibacterial potential of rosehip (*rosa canina*) fruits grown [Kuşburnu (*Rosa Canina*) Meyvesinin Antioksidan Kapasitesi ve Antimikrobiyel Potansiyelinin Araştırılması]. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 8(1), 103-109. <https://doi.org/10.35229/jaes.1240877>
- Demir, N., Yildiz, O., Alpaslan, M., & Hayaloglu, A. A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa L.*) fruits in Türkiye. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 126-133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038>
- Duru, N., Karadeniz, F., & Erge, H. S. (2012). Changes in bioactive compounds, antioxidant activity and hmf formation in rosehip nectars during storage. *Food And Bioprocess Technology*, 5(7), 2899-2907. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0657-9>
- Esin Yücel, E., Kaya, C., Topuz, S., & Bayram, M. (2024). Farklı tatlandırıcılar kullanılarak üretilen hindistan cevizi marmelatlarının özelliklerinin belirlenmesi. *Journal of New Results in Engineering and Natural Sciences*, 2023(19), 10-18. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jrens/issue/79158/1317186>
- Ghendov-Mosanu, A., Cristea, E., Patras, A., Sturza, R., & Niculaua, M. (2020). Rose hips, a valuable source of antioxidants to improve gingerbread characteristics. *Molecules*, 25(23).
- Kalın, P., Gülçin, I., & Gören, A. (2015). Antioxidant activity and polyphenol content of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*). *Records of Natural Products*, 9, 496-502.
- Kaplan B., & Okcu, Z. (2020). Hünnap meyvesinden üretilen marmelatların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(4), 2649-2658.
- Kaya, C., Esin Yücel, E., Bayram, M., Meşe, C., Aybakan, E., Gökgez, G., & Sözer, T. T. (2016). Trabzon hurması (*diospyros kaki l.*) bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 107-112. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ataunizfd/issue/27846/294688>
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 20(4), O255-266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
- Memiş Kocaman, E., & Sormaz, Ü. (2023). Fonksiyonel bir besin olan kuşburnu meyvesinin Türkiye’de tüketimi. *Safran Kültür ve Turizm Araştırmaları Dergisi*, 6(3), 435-453. <https://dergipark.org.tr/en/pub/saktad/issue/81481/1326143>
- Öz, M., Baltacı, C., & Deniz, İ. (2018). Gümüşhane yöresi kuşburnu (*Rosa canina l.*) ve siyah kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia l.*) meyvelerinin C vitamini ve şeker analizleri. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 284-292. <https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.327635>
- Özbey, A., Öncül, N., Tokatlı, K., Yıldırım, M., & Yıldırım, Z. (2017). Determination of some physicochemical and microbiological properties of rosehip marmalades. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(4), 358-365. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i4.358-365.1171>
- Özdemir, F., Aksu, M. İ., & Nas, S. (1997). Isil işlemsiz elde edilen kuşburnu pulplarından farklı pulp/şeker oranlarında üretilen marmelatların kalite özellikleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3(2), 353-358. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/pajes/issue/20548/218995>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sagdic, O., Toker, O. S., Polat, B., Arici, M., & Yılmaz, M. T. (2015). Bioactive and rheological properties of rose hip marmalade. *Journal Of Food Science And Technology-Mysore*, 52(10), 6465-6474. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1753-z>
- Suna, S., Kalkan, S., Dinç, M., & Çopur, Ö. U. (2023). Production of low calorie persimmon marmalades with stevia and maltitol: physicochemical properties and in vitro bioaccessibility of polyphenols. *Journal Of Food Measurement And Characterization*, 17(1), 1082-1095. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01676-9>

- Topal, M., Topal, F., & Yılmaz, F. (2024). Exploring the impacts of *Angelica purpurascens* extracts on anticholinergic, antidiabetic, antibacterial potential, and antioxidant capacity. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 14(2), 790-804.
- Topdaş, E. F., Şengül, M., Doğan, H., & Serencam, H. (2018). Artvin İlinde geleneksel olarak üretilen farklı marmelat çeşitlerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri, antioksidan aktiviteleri ve fenolik profilleri. *Akademik Gıda*, 16(1), 51-59. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.415888>
- Topuz, S., Kaya, C., Bayram, M., & Kola, O. (2019). Alıç marmelatı üretiminde farklı tatlandırıcı kullanımının ürün özelliklerine etkisi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 8(3), 180-192. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gbad/issue/50458/649756>
- Uçan Türkmen, F., Bingöl, B. N., Şahin, E., Özkaraman, F., & Tekin, Z. (2019). Erik (*Prunus domestica*) bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi. *Gıda*, 44(4), 707-718. <https://doi.org/10.15237/gida.GD19065>
- Uğuzdoğan, E., Kamberoğlu, N., Olçeser, C. B., Düzyol, F., Cücen, Z., & Hajıyev, V. (2024). Kuşburnu (*Rosa canina* L.) meyvesi ve atıklarından pektin ekstraksiyonu. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 30(1), 109-118. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/pajes/issue/83370/1445354>
- Vural, S. (2023). Çorum yöresinde geleneksel yöntemlerle üretilen kuşburnu marmelatlarının bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Hitit Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Çorum*.
- Yıldız, O., & Alpaslan, M. (2012). Properties of rose hip marmalades. *Food Technology And Biotechnology*, 50(1), 98-106.
- Yıldız Turgut, D., Tanriseven, M., Bayır Yeğin, A., Gölüklü, M., Tokgöz, H., & Kola, O. (2023). Düşük şekerli turunc marmelatı üretiminde Rebaudioside A kullanımının araştırılması. *Gıda*, 48(4), 872-887. <https://doi.org/10.15237/gida.GD23052>
- Yolcu Ömeroğlu, P., & Acoğlu, B. (2020). Nar suyu ve yeşil çay ilaveli kalorisi azaltılmış fonksiyonel geleneksel karışık meyve marmelatı üretimi. *Akademik Gıda*, 18(2), 143-155. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.758817>



Investigation of the Pesticide Residues and Elemental Composition in Tomato and Cucumber samples in Tekirdağ (Türkiye) and Mamuşa (Kosova)

Serap Duraklı Velioglu^{1,a}, Kadir Gürbüz Güner^{1,b}, Zana Sahiti Mehmeti^{2,c}, Özgür Sağlam^{3,d}, Hasan Murat Velioglu^{4,e,*}

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 59030, Tekirdağ, Türkiye.

²Priştina Üniversitesi, Ziraat ve Veteriner Fakültesi, Tarla ve Bahçe Bitkileri Bölümü, Priştina, 10000, Kosova.

³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 59030, Tekirdağ, Türkiye.

⁴Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 59030, Tekirdağ, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 19.08.2024 Accepted : 10.10.2024</p> <p>Keywords: <i>Lycopersicon lycopersicum</i> <i>Cucumis sativus</i> L. LC-MS/MS Pesticide residue analysis Elemental analysis</p>	<p>The aim of this study is to investigate the presence of pesticide residues and toxic metals in tomato and cucumber samples grown in Tekirdağ (Türkiye) and Mamuşa (Kosova). In this study, 21 tomato and 17 cucumber samples obtained from Tekirdağ and Mamuşa were analyzed for pesticide residues and elemental composition. Active substances analyzed in this study were abamectin, acetamiprid, carbendazim, chlorpyrifos methyl, imidacloprid, metaflumizone, propineb and indoxacarb. Additionally, 26 elements were examined in tomato and cucumber samples. None of the samples found as containing pesticide residues over maximum residue limits (MRL). Acetamiprid was detected in 16 samples of tomatoes (0.25-267 µg kg⁻¹) and in 10 samples of cucumbers (0.30-202 µg.kg⁻¹). Imidacloprid was found only in 5 samples of tomatoes (4.38-8.83 µg kg⁻¹). Indoxocarb was detected in one sample of tomatoes (21.80 µg.kg⁻¹). Propineb was found in all cucumber samples collected from Mamuşa (187-1090 µg kg⁻¹). Regarding toxic metal analysis results, tin was detected in 9 samples of tomatoes (10.3-12.8 µg kg⁻¹) and in 2 samples of cucumbers (10.9-13.4 µg kg⁻¹). Nickel was found in only one sample each of tomatoes (14.7 µg kg⁻¹) and cucumbers (11.3 µg kg⁻¹) collected from Tekirdağ. Aluminum was detected in 3 cucumber samples analyzed (10.0-36.1 µg kg⁻¹). The absence of lead, cadmium, and mercury in any of the samples is a positive outcome. It can be concluded that the residues detected in the examined samples are not at levels that would pose a risk to human health. Nonetheless, the presence of examples showing the potential of water, fertilizers, and pesticides used in agricultural production to leave residues in the final product should encourage producers to continue practicing good agricultural practices.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2328-2337, 2024

Domates ve Hıyar Örneklerinde Element İçeriğinin ve Pestisit Kalıntılarının Araştırılması: Tekirdağ (Türkiye) ve Mamuşa (Kosova) Örneği

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 19.08.2024 Kabul : 10.10.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Lycopersicon lycopersicum</i> <i>Cucumis sativus</i> L. LC-MS/MS Pestisit kalıntı analizi Elemental analiz</p>	<p>Bu çalışmanın amacı, Mamuşa (Kosova) ve Tekirdağ'da yetiştirilen domates ve hıyarlarda yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin kalıntılarının ve bazı toksik metallerin varlığının araştırılmasıdır. Çalışma kapsamında Tekirdağ ve Mamuşa'dan toplanan 21 domates ve 17 hıyar numunesinde pestisit kalıntı ve element analizleri gerçekleştirilmiştir. Pestisit etken maddeleri olarak abamectin, acetamiprid, carbendazim, chlorpyrifos methyl, imidacloprid, metaflumizone, propineb ve indoxacarb seçilmiştir. Elemental analizde ise bazı toksik metaller dahil 26 elementin taraması yapılmıştır. İncelenen örneklerin hiçbirisinde maksimum kalıntı limiti (MRL) üzerinde pestisit kalıntısı saptanmamıştır. Acetamiprid domateste 16 örnekte (0,25-267 µg kg⁻¹), hıyarda 10 örnekte (0,30-202 µg kg⁻¹), imidacloprid sadece domateste 5 örnekte (4,38-8,83 µg kg⁻¹), indoxocarb domateste bir örnekte (21,80 µg kg⁻¹), propineb Mamuşa'dan toplanan tüm hıyar örneklerinde (187-1090 µg kg⁻¹) tespit edilmiştir. Elemental analiz sonuçları incelendiğinde kalay domateste 9 örnekte (10,3-12,8 mg kg⁻¹), hıyarda 2 örnekte (10,9-13,4 mg kg⁻¹), nikel sadece Tekirdağ'dan toplanan birer domates (14,7 mg kg⁻¹) ve hıyar (11,3 mg kg⁻¹) örneğinde tespit edilmiştir. Alüminyum ise analizi yapılan 3 hıyar örneğinde (10,0-36,1 mg.kg⁻¹) tespit edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde kurşun, kadmiyum ve civaya rastlanmaması olumlu bir durumdur. İncelenen örneklerde tespit edilen kalıntılarının insan sağlığı için risk oluşturacak düzeyde olmadığı ifade edilebilir. Ancak tarımsal üretimde kullanılan su, gübre ve pestisitlerin son üründe kalıntı bırakma potansiyeline sahip olduğunu gösteren örnekler olması, üreticileri iyi tarım uygulamalarını sürdürmeye teşvik etmelidir.</p>

^a svelioglu@nku.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-9161-6286>

^b kguner@nku.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0002-6676-560X>

^c sahitiizana@gmail.com

^c <https://orcid.org/0009-0008-7249-3533>

^d osaglam@nku.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0003-3138-2884>

^e mvelioglu@nku.edu.tr

^e <https://orcid.org/0000-0002-8275-6965>



Giriş

Son yıllarda tarımsal ürünlerin güvenilirliği ve sağlık üzerine olası etkileri üzerindeki tartışmalar artmış olup, tüketiciler güvenli gıdaya ulaşma konusunda daha fazla sorgulayıcı tavır sergilemeye başlamıştır. Diğer taraftan, üretilen tarımsal ürünlerin gerek iç pazarda gerekse uluslararası ticarete değerlendirilmesi sırasında, içerdikleri kontaminantlara ilişkin mevzuatta belirtilen limitlere uygun olması gerekmektedir. Bu hususta birçok ülke kendi mevzuat ve düzenlemelerini yayınlarken, Avrupa ve dünyada tarımsal ürünlerin güvenliğinden sorumlu yetkili kuruluşlar da bu ürünler üzerindeki denetimlerini arttırmıştır. Gıda olarak tüketilen sebze ve meyvelerin besleyici bileşenleri, fiziksel ve mikrobiyolojik kalite özellikleri önemini her zaman korurken, bu ürünlerde bulunabilen sağlığa zararlı kalıntıların miktarları da son yıllarda önemli bir kalite unsuru haline gelmiştir (Tözün & Akar, 2022). Özellikle zirai mücadele amacıyla kullanılan pestisitlerin ve çevresel kaynaklı toksik metallerin sebze ve meyvelerdeki kalıntıları birçok ülkede çok katı kurallarda sınırlandırılmış olup, bu sınırlara uygun olmayan ürünler tüketicilere sunulmamaktadır.

Tarım ürünlerini zararlı böcekler, patojen organizmalar ve yabancı otlardan korumak, ürünlerin kalitesini ve verimini arttırmak için tarımsal savaşım yöntemleri kullanmak gerekebilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de tarım ilaçlarının (pestisitler) kullanıldığı kimyasal savaşımdır. Kimyasal savaşımın diğer yöntemlere göre en büyük avantajı hızlı sonuç vermesidir. Ancak bilinçsiz ve kontrolsüz olarak kullanıldığında çevre ve ürün üzerinde kalıntı sorunlarının ortaya çıkması kaçınılmaz bir durumdur (Özercan & Taşçı, 2022). Pestisit kalıntıları; bir gıda, tarımsal ürün veya hayvan yeminde pestisit kullanımı sonucu kalan herhangi bir madde veya maddeler grubudur. Bu terim, pestisitlerin dönüşüm ürünleri, metabolitleri, reaksiyon ürünleri ve toksikolojik önemi olabilen safsızlıklar gibi tüm pestisit türevlerini ifade etmektedir. Ürünlerde bulunabilecek kalıntı değeri ise MRL (Maksimum kalıntı limiti) olarak adlandırılmakta olup, iyi bir tarımsal uygulamayla elde edilmiş ürünlerde bulunabilecek pestisit kalıntısının maksimum konsantrasyonudur (Çakmak Sancar ve ark., 2022). Tarım ilaçlarının tarımsal ürünlerdeki kalıntıları ile ilgili çalışmalar, 1950'li yıllarda başlamıştır (Durmuşoğlu & Çelik, 2001). Takip eden yıllarda hız kazanan çalışmalar, 2000'li yıllarla beraber hem ülkemizde hem de dünyada, tarım ürünlerinde pestisit kalıntılarının sebepleri, pestisitlerin parçalanma kinetiği (Ahat Şarkaya, 2015; Balkan ve Kara, 2023; Balkan ve ark., 2024), sağlık üzerindeki etkileri, kalıntı miktarının tespiti (Kaya & Tuna, 2019; Polat & Tiryaki, 2018; Polat & Tiryaki, 2019; Kazar Soydan ve ark.,

2021; Balkan & Kara, 2022), kalıntıların uzaklaştırılma yöntemleri (Polat, 2021; Balkan ve Yılmaz, 2022; Evran ve ark., 2024) ve pestisit alternatifleri üzerinde yoğunlaşarak devam etmektedir (Balcı & Durmuşoğlu, 2020; Siddique & Malik, 2022; Yang ve ark., 2024).

Domates, patlıcangiller (Solanaceae) familyasından olup bilimsel ismi '*Lycopersicon lycopersicum* (Syn. *L. esculentum*)'dur. Hıyar ise kabakgiller (Cucurbitacea) familyasından olup bilimsel ismi '*Cucumis sativus* L.'dur. Türkiye İstatistik Kurumu 2022 yılı verileri incelendiğinde Türkiye'de sebze üretimi yıllık 31,6 milyon ton seviyesindedir. Bu üretimin 13 milyon tonu domates ve yaklaşık 2 milyon tonu hıyar olup, bu iki ürünün üretimi yapılan sebzeler arasında ilk iki sırada yer almaktadır (Anonim, 2023a). Ülkemiz zirai üretim açısından modernize olmuş bir ülke olmasına karşın yaş sebzelerde pestisit kalıntısı sorunu halen yeterli seviyede çözüme kavuşmamıştır (Balkan & Kara, 2022). Diğer taraftan, Kosova'nın 1,1 milyon hektar tarım arazisinin yaklaşık 588.000 hektarı (%53'ü) ekilebilir alandan oluşmaktadır ve ekilebilir arazi açısından oldukça şanslı bir ülkedir. Ülkede yaklaşık 30.000 hektarlık arazide sebze tarımı yapılmakta olup özellikle gıda ve tarım ürünlerinin kalite standartları ile ilgili ciddi problemler yaşanmaktadır (Berisha ve ark., 2013).

Ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan domates ve hıyarlarda sıklıkla kullanılan pestisit etken maddeleri, bu maddelere ait Avrupa Birliği Maksimum Kalıntı Limitleri ve bu maddelere ait teknik bilgiler Çizelge 1'de sunulmuştur (Anonim, 2023b). Çalışmada, Çizelge 1'de yer alan etken maddelerin ürünlerde tespiti için analizler yapılmıştır.

Gıda bulaşanları içerisinde yer alan bir diğer grup da toksik metallerdir. Metal ve metaloidler, gıdaların doğal yapısında bulunabilen veya çevre, teknolojik işlemler ya da ambalaj materyalleri gibi değişik yollardan gıdaya bulaşabilen kimyasal inorganik maddelerdir (Anonim, 2023c). Yabancı olarak yetişen veya gıda/yem amaçlı olarak kültüre edilen bitkilerin, topraktan aldıkları birçok bileşiği depolama özellikleri mevcuttur. Bu maddelerden bazıları, toksik maddeler olabilmektedir. Ayrıca, endüstriyel, askeri veya diğer bazı faaliyetler sonucu açığa çıkan birçok toksik metal de antropojenik kirleticiler olarak insanoğlunun karşısına çıkmaktadır. Avrupa Birliğinde, hammaddelerde rutin izleme programına dahil olan toksik metaller, civa, kurşun, kadmiyum, arseniktir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde de sebze ve meyvelerde bulunabilecek maksimum kurşun (0,10 mg kg⁻¹) ve kadmiyum (0,05 mg kg⁻¹) miktarları için limit verilmektedir (Anonim, 2023c).

Çizelge 1. Domates ve hıyar yetiştiriciliğinde yaygın zararlı, hastalık, önerilen etkili maddeler, bekleme süreleri ve MRL değerleri
Table 1. Common pests, diseases, recommended active ingredients, residual life and MRL values in tomato and cucumber cultivation

Pestisit Adı	Hastalık- Zararlı	Bekleme Süresi (gün)	Avrupa Birliği'nde Maksimum Kalıntı Limitleri (mg kg ⁻¹)	
			Domates	Hıyar
Metaflumizone	Domates güvesi	3	0,7	0,4
Indoxacarb	Domates güvesi	3	0,5	0,5
Acetamiprid	Beyaz sinek	3	0,5	0,3
Imidacloprid	Yaprak biti	7	0,3	0,5
Chlorpyrifos methyl	Bozkurt	7	0,01	0,01
Abamectin	Kırmızı örümcek	3	0,09	0,04
Carbendazim	Külleme	7	0,3	0,1
Propineb	Mildiyö	7	3	2

Ülkemizde ve dünyada tarım ürünlerinde pestisit ve toksik metal varlığının saptanmasına yönelik çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir (Elmastaş ve ark., 2022; Khoshnam ve ark., 2022; Kusu ve ark., 2022; Varol ve ark., 2022). Literatürde yer alan tarama çalışmalarından elde edilen verilerin, hem mevcut durumu ortaya koyma hem de alınabilecek önlemler için yol gösterici olarak kullanılması açısından önemlidir. Kosova'da üretilen ürünlerdeki pestisitler, toksik metaller veya bu ürünlerin elemental kompozisyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Tekirdağ ve çevresinde üretilen ürünlerde pestisit ve toksik metal kalıntılara ilişkin çalışma sayısı ise sınırlıdır (Özcan & Balkan, 2017).

Bu çalışmanın amacı, Priştina Üniversitesi (Kosova) ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi (TNKÜ) (Türkiye) arasında yürütülen ikili işbirliği kapsamında, Mamuşa (Kosova) ve Tekirdağ'da yetiştirilen domates ve hıyarlarda, yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin kalıntılarının ve bazı toksik metallerin varlığının araştırılmasıdır.

Materyal ve Metod

Materyal

Çalışma kapsamında materyal olarak kullanılan hıyar ve domates örnekleri Tekirdağ ve Mamuşa'dan temin edilmiştir. Deney desenine göre Tekirdağ'dan yedi hıyar (TH1, TH2...) ve 11 domates (TD1, TD2...) örneği, Mamuşa'dan 10 hıyar (MH1, MH2...) ve 10 domates (MD1, MD2...) örneği, farklı üreticiler tarafından üretildiği bilinen, tam olgunluk döneminde toplanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan tüm standart ve kimyasallar minimum %98,5 saflıkta olacak şekilde Sigma Aldrich (St.Louis, USA) firmasından sağlanmıştır.

Örnek Hazırlama

Mamuşa'dan toplanan hıyar ve domates örnekleri aynı gün içerisinde Priştina Üniversitesi Ziraat Fakültesi laboratuvarlarına getirilmiştir. Örneğin tamamı laboratuvar tipi blender ile parçalanarak homojen hale getirildikten sonra 100 g örnek numune kaplarına alınmış ve transfer zamanına kadar -4°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm örnekler içerisinde buz kasetleri bulunan termo kutular ile TNKÜ Laboratuvarlarına getirilmiştir. Tekirdağ'dan toplanan örneklere de aynı işlemler yapılmış olup, örnekler analiz edilinceye kadar -4°C'de muhafaza edilmiştir.

Pestisit Kalıntı Analizi

Çalışma materyali olan tarımsal ürünlerde en fazla kullanılan zirai ilaçlarda bulunması muhtemel (Anonim,

2023d) ve analitik standartları temin edilebilen toplamda sekiz pestisit etken maddesi (abamectin, acetamiprid, carbendazim, chlorpyrifos methyl, imidacloprid, metaflumizone, propineb ve indoxacarb) analiz edilmiştir. Pestisitlerin seçiminde, domates ve hıyarda ruhsatlı olmaları ve yetiştiriciler tarafından tercih ediliyor olmaları, Türk Gıda Kodeksi'nde domates ve hıyara ait MRL değerlerinin bulunuyor olması gibi kriterler dikkate alınmıştır.

Domates örneklerinin ekstraksiyonu QuEChERS metodu ile gerçekleştirilmiştir (AOAC 2007.01). PTFE falkon tüpleri içerisine 15 g domates örneği tartılmış ve üzerine %1'lik asetik asit içeren 15 ml asetone nitril ilave edilmiştir. İki dakika vortekslenildikten sonra 6 g MgSO₄ (magnezyum sülfat) ve 1,5 g NaOAc (sodyum asetat) ilave edilerek manuel olarak çalkalanmış ardından 2 dk vortekslenmiştir. Tüp içerisindeki örnek 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Üst fazdan 8 ml alınarak falkon tüpüne aktarılmış ve içerisine 1200 mg MgSO₄ ve 400 mg PSA (primer sekonder amin) eklenmiştir. İki dakika vortekslemenin ardından 4500 rpm'de 5 d santrifüjlenen örneğin üst fazı 0,2 µm gözenek çapına sahip şırınga filtreden süzülerek vialde alınmış ve enjeksiyon için muhafaza edilmiştir. Hıyar örneklerinin ekstraksiyonu, Shimadzu "Multi-residue analysis of pesticides in agricultural products using QuEChERS and SFC/MS" uygulama çalışmasına göre yapılmıştır (Fujito ve ark., 2016). Örneklerden 10 g tartılarak 50 ml'lik PTFE falkon tüplerine alınmıştır. Örnek üzerine 10 ml asetone nitril ilave edilerek 2 dk vortekslenmiştir. Tüp içerisine 4 g MgSO₄, 1 g NaCl (sodyum klorür), 1 g TSCD (trisodyum sitrat dihidrat) ve 0,5 g sodyum sitrat monobazik eklenerek manuel olarak çalkalanmış ve ardından 2 dk vortekslenmiştir. Bu işlemin ardından 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenen örneğin üst fazından 6 ml alınarak, içerisine 1200 mg MgSO₄ ve 400 mg PSA bulunan, 15 ml'lik PTFE falkon tüplerine aktarılmıştır. İki dakika vortekslenen tüpler, 4500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve üst fazdan alınan örnek 0,2 µm gözenek çapına sahip şırınga filtreden süzülerek vialde alınmış ve enjeksiyon için muhafaza edilmiştir. Pestisit analizinde, 3200 QTRAP LC-MS/MS (AB Sciex LLC, MA, USA) sistemi kullanılmıştır. Analizler, AOAC Resmi Metodu 2007.01'e göre gerçekleştirilmiştir. Örnek PTFE filtrelerden süzülüp direkt viallere alınmış ve cihaza enjekte edilmiştir. Kromatografik ayırmada Poroshell 120 SB-C8 (3,0x100mm, 2,7µm) kolon kullanılmış, kolon fırın sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Mobil Faz A : 20 mM Amonyum format, H₂O, Mobil Faz B : ACN olmak üzere gradient profili Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Gradient Profili

Table 2. Gradient Profile

Zaman	Akış (ml/dak)	%A	%B
00:00:01	0,3	50	50
00:01:05	0,3	50	50
00:02:00	0,3	5	95
00:05:00	0,3	5	95
00:05:10	0,3	50	50
00:07:00	0,3	50	50

Çalışmada kullanılan pestisitlerin MRL değerleri göz önünde bulundurularak sekiz pestisitten en düşük MRL baz alınmış ve kalibrasyon eğrisi buna göre 50 µg kg⁻¹, 100 µg kg⁻¹, 200 µg kg⁻¹, konsantrasyonlarında çizilmiştir (Anonim, 2023b). Yukarıdaki ekstraksiyon metodları uygulanarak içerisinde aranılan sekiz pestisit de olmadığı tespit edilen hıyar ve domates örneklerine propineb hariç tüm pestisitlerden 50 µg kg⁻¹, 100 µg kg⁻¹, ve 200 µg kg⁻¹, olacak şekilde spike yapılmış ve ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Propineb için 2000 µg kg⁻¹, 4000µg kg⁻¹, 8000 µg kg⁻¹ konsantrasyonlarında spike yapılmıştır. Ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstraktlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve numunelerdeki pestisit konsantrasyonları bu eğri baz alınarak hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmaları; yedi analit için 100 µg kg⁻¹ ve 200 µg kg⁻¹ konsantrasyonlarında; propineb için 4000 µg kg⁻¹ ve 8000 µg kg⁻¹ konsantrasyonlarında üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Elemental Kompozisyon Analizi

Elemental kompozisyonu belirlenecek örnekler, EPA 3050B metodu kullanılarak ön işleme tabi tutulmuştur (EPA, 1996). Etüvde kurutulan örnekler öğütüldükten sonra 0,5 g örnek teflon yakma tüplerine alınmıştır. Mikrodalga ortamında numune tipine bağlı olarak 200°C'de 20 d basınç altında ısıtılan örnekler çözünür hale getirilmiştir. Örnekler saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Berrak hale gelen örnekler filtre kağıdından süzülerek cihaza verilerek üzere hazır hale getirilmiştir. Analizlerde ICP-OES (Spectro Blue, Spectro GmbH, Germany) cihazı kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Üçer paralelli olarak gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen veriler, ortalama olarak verilmiştir. İki farklı bölgeden elde edilen örneklerde, pestisit ve mineral madde parametrelerin farklılaşmasını incelemek amacıyla SPSS 17.0 (SPSS, 2008) programı kullanılarak Mann Whitney U testi uygulanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Örneklerde pestisit kalıntısı tespiti geri kazanım çalışması sonuçları

Domates örneklerinde gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasının sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Geri kazanım değerleri % 80,1-103 aralığında olup, elde edilen değerler, SANTE (11312/2021) dokümanına uygun bulunmuştur. LOQ değerleri ise, 0,06- 19,50 µg kg⁻¹ aralığında elde edilmiştir. Avrupa Birliği pestisit kalıntıları veri tabanında bildirilen MRL değerleri ile kıyaslandığında değerlendirme limitlerinin bu çalışma özelinde yeterli olduğu ifade edilebilir (Anonim, 2023b). Elde edilen LOQ değerlerinin, abamectin (domates için 90 µg kg⁻¹) ve propineb (domates için 2000 µg kg⁻¹) için belirlenmiş olan MRL değerlerinin oldukça altında olduğu görülmektedir. Hassan ve ark. (2019) tarafından domateslerde pestisit kalıntılarının tespiti konusunda yapılan bir çalışmada chlorpyrifos için LOD değeri 3 µg kg⁻¹, LOQ değeri ise 9 µg kg⁻¹ olarak bildirilmiş olup, mevcut çalışmada elde edilen değerler, bu verilerle uyumlu gözükmektedir. Hıyar örneklerinde gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasının sonuçları Çizelge 5'de verilmiştir. Çalışmada hıyar için elde edilen geri kazanım değerleri % 96,5- 105 aralığında olup SANTE (11312/2021) dokümanına uygun bulunmuştur. Analiz edilen pestisit etken maddeleri için belirlenen LOQ değerleri, abamectin ve propineb hariç olmak üzere 0,06 – 5,52 µg kg⁻¹ aralığında olup abamectin ve propineb için elde edilen LOQ değerleri ise literatürde elde edilen değerlere göre yüksektir. Sungur & Tunur (2012) tarafından yapılan bir çalışmada farklı sebze ve meyvelerde pestisit kalıntısı tayini üzerinde çalışılmış olup 175 pestisit etken maddesi analiz edilmiştir. Acetamiprid, imidacloprid, carbendazim gibi ortak etken maddelerin de araştırdığı çalışmada LOQ değeri tüm etken maddeler için 3 µg kg⁻¹ seviyesinde verilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen LOQ değerlerinin, abamectin (hıyar için 40 µg kg⁻¹) ve propineb (hıyar için 2000 µg kg⁻¹) için belirlenmiş olan MRL değerlerinin altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 3. Etken madde kütle geçişleri

Table 3. MS MS transitions

Pestisit	PI	YI	AZ	DP	EP	CEP	CE
Abamectin	890,359	305,200	4,20	51	7,5	40	35
Abamectin	890,359	145,200	4,20	51	7,5	40	43
Carbendazim	192,110	160,100	2,00	21	7	12	23
Carbendazim	192,110	132,100	2,00	21	7	12	37
Chlorpyrifos meth	323,831	125,000	3,70	41	12	28	27
Chlorpyrifos meth	323,831	291,800	3,70	41	12	28	19
Imidacloprid	256,085	175,100	2,00	46	6	14	23
Imidacloprid	256,085	209,100	2,00	46	6	14	23
Indoxacarb	528,007	203,100	3,70	66	7,5	30	49
Indoxacarb	528,007	218,200	3,70	66	7,5	30	27
Metaflumizone	507,132	178,200	3,70	111	11,5	20	31
Metaflumizone	507,132	287,100	3,70	111	11,5	20	31
PTU	117,071	100,100	1,70	36	6	10	13
PTU	117,071	60,000	1,70	36	6	10	37
Acetamiprid	223,083	126,100	2,10	56	6,5	12	29
Acetamiprid	223,083	99,100	2,10	56	6,5	12	49

PI: Prekürsör iyon; YI: Yavru İyon; AZ: Altkonma zamanı (dk); DP: Declustering potential (DP) (volts); EP: Entrance potential, (EP) (volts); CEP: Collision cell entrance potential (CEP) (volts); CE: Collision energy (CE) (volts)

Çizelge 4. Domateste pestisit geri kazanım sonuçları

Table 4. Percent recovery of pesticides in tomato

Pestisit	Analit konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	50	100	200	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	Geri kazanım (%)			
Abamectin	102,0	96,3	101,0	19,50
Acetamiprid	99,1	101,0	99,5	0,15
Carbendazim	80,1	103,0	90,0	0,06
Chlorpyrifos methyl	98,5	102,0	99,2	3,00
Imidacloprid	97,3	104,0	98,7	0,66
Indoxacarb	97,3	104,0	98,6	0,60
Metaflumozine	98,6	102,0	99,3	0,18
	Analit konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	2000	4000	8000	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	Geri kazanım (%)			
Propineb	94,1	109,0	97,0	16,50

Çizelge 5. Hıyarda pestisit geri kazanım sonuçları

Table 5. Percent recovery of pesticides in cucumber

Pestisit	Analit konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	50	100	200	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	Geri kazanım (%)			
Abamectin	96,5	105,0	98,3	33,00
Acetamiprid	97,9	103,0	99,0	0,06
Carbendazim	99,2	101,0	99,6	0,06
Chlorpyrifos methyl	98,4	102,0	99,2	5,52
Imidacloprid	98,9	102,0	99,4	1,50
Indoxacarb	97,3	105,0	98,5	0,96
Metaflumozine	97,2	104,0	98,6	1,20
	Analit konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	2000	4000	8000	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	Geri kazanım (%)			
Propineb	99,0	101,0	99,5	39,00

Pestisit Kalıntısı Analiz Sonuçları

Çizelge 6'da Tekirdağ'dan ve Mamaşa'dan temin edilen domates örneklerinde yapılan analizlerin sonuçları sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde hiçbir örnekte MRL değeri üzerinde etken madde tespit edilmediği görülmektedir. Abamectin, carbendazim, chlorpyrifos methyl, metaflumazine ve propineb kalıntısı hiçbir domates örneğinde bulunmamıştır. Diğer taraftan, acetamiprid 21 örneğin 16'sında LOQ değerinin üzerinde bulunmuş olup, en yüksek değer Tekirdağ'dan temin edilen 3 numaralı domates örneğinde $267 \mu\text{g kg}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada, 21 örneğin beş tanesinde imidacloprid ve bir tanesinde de indoxacarb kalıntısına MRL değerlerinin altında olacak şekilde rastlanmıştır. İki bölgeden alınan domates örnek gruplarının ortalama acetamiprid ve imidacloprid içeriği değerleri, Mann Whitney U-testi ile karşılaştırılmış ve iki gruba ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

Tokat ilinde tüketicilere arz edilen domates numunelerinde neonikotinoid grubu (acetamiprid, imidacloprid, thiametoxam, clothianidin ve thiacloprid) insektisitlerin kalıntı düzeylerinin belirlenmesi amacıyla toplam 30 domates örneği ile yapılan çalışmada, örneklerin 16'sında ise en az bir etken madde tespit edilmiş; bir örnekte tespit edilen acetamiprid miktarının ise ($298.50 \mu\text{g kg}^{-1}$) MRL seviyesini aştığı belirlenmiştir (Balkan ve Kara,

2019). Balkan ve Kara (2022) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da, Tokat'tan elde edilen domates örneklerinde, diğer bazı pestisitlerin yanında $21,74 \mu\text{g kg}^{-1}$ düzeyinde acetamiprid belirlendiği bildirilmiştir. Jankowska ve ark. (2019) tarafından 2011-2014 yılları arasında Polonya'da toplanan domates örneklerinde yapılan pestisit kalıntısı taraması sonuçları incelendiğinde üründe kalıntı düzeylerinin $70-190 \mu\text{g kg}^{-1}$ arasında değiştiği ve incelenen ürünler arasında iki tanesinin MRL değerinin üzerinde acetamiprid kalıntısı içerdiği bildirilmiştir. Polat ve Tiryaki (2018) Çanakkale'de açık alanda yetiştirilen domateslerde pestisit kalıntısı taraması yapmışlardır. Dört farklı parselden domates örneği toplanarak yapılan çalışmada yedi farklı pestisit için kalıntı analizi gerçekleştirilmiş olup, mevcut çalışmaya benzer olarak chlorpyrifos-methyl taraması da yapılmıştır. Sonuçlar, hiçbir pestisit MRL seviyesinin üzerinde kalıntı bırakmadığı şeklinde bildirilmiştir. Özcan & Balkan (2017) tarafından Kırklareli'de yetiştirilen domateslerde organoklorinli pestisitlere ait kalıntıların araştırıldığı bir çalışmada 18 farklı etken madde analiz edilmiş, endrin ve methoxychlor dışındaki tüm kalıntılar, yasal limitlerin altında bulunmuştur. Mevcut çalışmada her ne kadar MRL değerlerinin altında kalıntıya rastlanmış olsa da belirli pestisitlerin ya direkt uygulamayla veya çevresel faktörlerin etkisi ile üründe bulunabildiği ifade edilebilir.

Çizelge 6. Domates örneklerinde pestisit kalıntısı sonuçları

Table 6. Pesticide residue results in tomato samples

Örnek Kodu	Pestisit Kalıntı Konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	AB	AC	CA	CM	IM	IN	ME	PR
TD1	-	0,31	-	-	4,50	-	-	-
TD2	-	0,29	-	-	8,83	-	-	-
TD3	-	267,00	-	-	4,74	-	-	-
TD4	-	0,35	-	-	6,77	21,80	-	-
TD5	-	1,12	-	-	-	-	-	-
TD6	-	0,54	-	-	-	-	-	-
TD7	-	0,37	-	-	-	-	-	-
TD8	-	0,33	-	-	-	-	-	-
TD9	-	0,25	-	-	-	-	-	-
TD10	-	0,25	-	-	-	-	-	-
TD11	-	0,99	-	-	-	-	-	-
MD1	-	-	-	-	-	-	-	-
MD2	-	1,60	-	-	-	-	-	-
MD3	-	19,00	-	-	-	-	-	-
MD4	-	0,51	-	-	-	-	-	-
MD5	-	-	-	-	-	-	-	-
MD6	-	-	-	-	-	-	-	-
MD7	-	0,39	-	-	-	-	-	-
MD8	-	-	-	-	-	-	-	-
MD9	-	-	-	-	4,38	-	-	-
MD10	-	27,20	-	-	-	-	-	-
MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	90	500	300	10	300	500	700	3000

AB: Abamectin; AC: Acetamiprid; CA: Carbendazim; CM: Chlorpyrifos methyl; IM: Imidacloprid; IN: Indoxacarb; ME: Metaflumozine; PR: Propineb

Çizelge 7. Hıyar örneklerinde pestisit kalıntısı sonuçları

Table 7. Pesticide residue results in cucumber samples

Örnek Kodu	Pestisit Kalıntı Konsantrasyonu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	AB	AC	CA	CM	IM	IN	ME	PR
TH1	-	-	-	-	-	-	-	-
TH2	-	-	-	-	-	-	-	-
TH3	-	-	-	-	-	-	-	-
TH4	-	-	-	-	-	-	-	-
TH5	-	202	-	-	-	-	-	-
TH6	-	-	-	-	-	-	-	-
TH7	-	-	-	-	-	-	-	-
MH1	-	8,82	-	-	-	-	-	553
MH2	-	14,10	-	-	-	-	-	916
MH3	-	3,26	-	-	-	-	-	687
MH4	-	1,47	-	-	-	-	-	300
MH5	-	25,2	-	-	-	-	-	568
MH6	-	10,9	-	-	-	-	-	1090
MH7	-	-	-	-	-	-	-	517
MH8	-	0,74	-	-	-	-	-	187
MH9	-	0,30	-	-	-	-	-	383
MH10	-	9,71	-	-	-	-	-	953
MRL ($\mu\text{g/kg}$)	40	300	100	10	500	500	400	2000

AB: Abamectin; AC: Acetamiprid; CA: Carbendazim; CM: Chlorpyrifos methyl; IM: Imidacloprid; IN: Indoxacarb; ME: Metaflumozine; PR: Propineb

Çizelge 7’de Tekirdağ’dan ve Mamaşa’dan temin edilen hıyar örneklerinde yapılan analizlerin sonuçları sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde taranan etken maddelerin hiçbir örnekte MRL üzerinde tespit edilmediği görülmektedir. Abamectin, carbendazim, chlorpyrifos methyl, metaflumazine, imidacloprid ve indoxacarb kalıntısı hiçbir hıyar örneğinde bulunmamıştır. Diğer taraftan, acetamiprid 17 örneğin 10’unda değerlendirme limitinin üzerinde bulunmuş olup en yüksek değer,

Tekirdağ’dan temin edilen 5 numaralı hıyar örneğinde 202 $\mu\text{g kg}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

İki bölgeden alınan hıyar örneklerinin ortalama acetamiprid ve propineb içeriği değerleri, Mann Whitney U-testi ile karşılaştırılmış ve iki gruba ait değerler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kosova’dan temin edilen tüm hıyar örneklerinde değerlendirme limitlerinin üzerinde propineb kalıntısına rastlanmıştır. Bölgede hıyar

yetiştiriciliğinde propineb etken maddeli pestisitlerin yaygın kullanıldığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde MRL değerinin çok altında olmasına karşın yine Kosova'dan temin edilen hıyarların biri hariç tamamında acetamiprid kalıntısına rastlanmıştır. Tekirdağ orijinli hıyarlarda ise acetamiprid bulunan bir örnek hariç herhangi bir pestisit etken maddesine rastlanmamıştır. Gölge ve ark. (2018) tarafından hıyar ve yeşil biberde pestisit kalıntılarının tayinine yönelik yapılan çalışmada 170 farklı etken madde araştırılmıştır. Hıyar örneklerinde en fazla tespit edilen pestisit etken maddesinin propamocarb olduğu ve bunu acetamipridin takip ettiği bildirilmiştir. Toplamda 170 örnek içinde 9 örnekte rastlanan acetamiprid kalıntısı seviyesinin 12-110 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aralığında olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada analizi yapılan ve mevcut çalışmada da yer alan bir diğer pestisit kalıntısı ise chlorpyrifos olmuştur. Bu etken maddenin de dört hıyar örneğinde ortalama 38 $\mu\text{g kg}^{-1}$ seviyesinde mevcut olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Balkan ve Kara (2022) tarafından yapılan çalışmada da hıyar örneklerinde, azoxystrobin, boscalid gibi pestisitlerin yanında, 9,90-51,53 $\mu\text{g kg}^{-1}$ düzeyinde acetamiprid belirlendiği, ayrıca MRL düzeyini aşan miktarda metrafenon tespit edildiği bildirilmiştir.

Domates ve hıyar da dahil olmak üzere birçok sebze ve meyvede pestisit kalıntısı tespiti üzerine yapılan çalışmalar uzun yıllardır sürmektedir. Hem ölkemizde hem de dünyada pestisit kullanımının mevcut durumunu ortaya koymak ve kalıntı miktarını azaltmak amacıyla yapılan bilimsel çalışmaların sayısındaki artış, çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Hepsağ (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, Akdeniz Bölgesi'nde domates yetiştiriciliği yapan 30 çiftiden temin edilen domateslerde pestisit kalıntısı analizi yapılmıştır. Mevcut alışma ile örtüşen abamectin, acetamiprid, carbendazim, chlorpyrifos methyl ve imidacloprid için de tarama sonuçlarının bildirildiği çalışmada örneklerin %74'ünde herhangi bir kalıntıya rastlanmamıştır. Acetamiprid içeren dört örnekte bulunan değerlerin, MRL değerinin altında olduğu bildirilmiştir. Kaya & Tuna (2019), İzmir ili özelinde yürüttükleri bir tarama çalışmasında domates ve hıyar da dahil olmak üzere farklı sebze ve meyvelerde pestisit kalıntısı analizi gerçekleştirmişlerdir. Hiçbir örnekte, analizi yapılan etken maddeleri için, MRL değerinin üzerinde kalıntı tespit edilmemiş olup, hıyar örneklerindeki acetamiprid kalıntı değeri ortalama 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Domates ve domates ürünlerinde yapılan bir çalışmada ise, toplam kalıntı miktarlarına bakıldığı zaman salada erken sezonda kalıntı miktarının en yüksek olduğu belirtilmiştir (Aysal ve ark. 1998). Ahat şarkaya (2015), domates ve biberde pestisitlerin parçalanma kinetiği ile ilgili yaptığı çalışmada, domateste ilk uygulamada deltamethrin hariç acetamiprid, chlorantraniliprole ve lambda cyhalotrinde parçalanmanın daha az olduğunu bildirmektedir. Arias ve ark. (2014), Kolombiya Bogota'da en çok tüketilen ürünlerden biri olan domateste, 24 farklı pestisiti araştırmış, sadece tek bir pestisitte (carbendazim) MRL değerinin aşıldığını bildirmiştir. Örneklerin % 70,5'inde en az bir pestisit kalıntısına rastlanılmış, bu değerlerin Bogota halk sağlığı açısından kabul edilebilir değerler arasında olduğu saptanmıştır.

Element analizi sonuçları

Çalışmada, hıyar ve domates örneklerinde, olgun ve satışa hazır haldeki domates ve hıyarların mineral madde içeriklerinin belirlenmesinin yanında, bazı toksik metallerin varlığı da araştırılmıştır. ICP-OES analizine LOQ değerleri, Ca, Mg, Na ve K için 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Mo, Pb ve Sb için 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, diğer elementler için 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Oral ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ICP-MS kullanılarak sebzelerde elemental analiz gerçekleştirilmiştir. Cihaz farklılığının ölçüm hassasiyetini doğrudan etkilemesi nedeniyle, mevcut çalışmada elde edilen değerlerden çok daha düşük LOQ değerleri rapor edilmiştir. Literatürde, toksik metaller, periyodik cetvelin üçüncü ya da daha yüksek periyodunda bulunan ve fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g cm^{-3} ten daha yüksek olan ve insan sağlığını tehdit eden metaller ile metalloidler için kullanılan genel bir terimdir. Bu gruba atom ağırlığı 24 olan kromla metal olmayan arsenik ve selenyum ile kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), kalay (Sn), alüminyum (Al), nikel (Ni), civa (Hg) ve inko (Zn) olmak üzere 60'tan fazla metal dahil edilmektedir (Duffus, 2002). Tarım topraklarındaki ve sulama sularındaki kirlilik, tarımda kullanılan kimyasal maddeler ve gübreler, endüstriyel kirlilik, hava kirliliği, atık sular, lağım atıkları, gıda işleme ekipmanları ve işleme prosesleri, bu potansiyel toksik elementlerin gıdalara kontaminasyonunun başlıca sebepleridir. Arsenik, yaygın olarak litosferde bulunan ve esasen madencilik faaliyetleri sırasında açığa çıkan bir metaloidtir. Bazı pestisitler de arsenik içermektedir. Arseniğin intoksikasyona neden olan akut dozu, 5 $\text{mg}'\text{dir}$. Letal dozu 50-500 mg arsenik oksittir. 2-5 mg günlük dozun uzun dönemli alınması sonucu toksisite görölmektedir. Civaya bağlı intoksikasyonların en önemli kaynağı, dimetil civa veya metil civanın klorür veya fosfat tuzları gibi civalı organik fungusitlerdir. İnorganik civa ise, plastik, kağıt, pil endüstrilerinde kullanılmaktadır. Atmosferdeki kadmiyumun en önemli kaynağı antropojenik orijinlidir. Atmosfere, kadmiyum içeren maddelerin işlenmesi ve yanması sonucu ulaşmaktadır. Kadmiyum kirliliğinin bir nedeni de mineral gübreler ve fungusitlerdir (Püssa, 2008).

Çizelge 8'de Tekirdağ ve Mamaşa'dan toplanan 21 adet domates örneğine ait elemental analiz sonuçları sunulmuştur. Taraması yapılan 26 elementten 12 tanesine ait değerler en az bir domates örneğinde LOQ üzerinde tespit edilmiş olup Ni için sadece Tekirdağ'dan temin edilen 9 numaralı örnekte LOQ üzerinde sonuç alınmıştır. Örnekler arasındaki farklılıkların, yetiştirilen toprak, sulama rejimi, gübreleme ve diğer çevresel faktörler sebebiyle olduğu düşünölmektedir. Alüminyum, arsenik, bizmut, kadmiyum, kobalt, krom, civa, molibden, kurşun, platin, kükürt, antimon, selenyum ve titanyum elementlerinin, ulaşılabilen LOQ seviyesinin üzerinde kalıntısı tespit edilememiştir. Domates örneklerinin mineral madde içerikleri belirlenerek, elde edilen sonuçlar, Mann Whitney U-testi ile karşılaştırılmıştır. Mineral madde (Na, Mg, Ca, P, Fe, Cu, B, Mn, Zn, Ni, Sn ve Al) içeriği açısından, iki farklı yöreye ait domates örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ($p > 0,05$), sadece K içeriği açısından iki grup arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 8. Domates örneklerinin elemental kompozisyonu*

Table 8. Elemental composition of tomato samples

Örnek	Na	Mg	K	Ca	P	Fe	Cu	B	Mn	Zn	Ni	Sn
TD1	213,0	920,5	24882,9	669,6	3504,7	54,7	14,4	10,2	0,0	21,9	nd	nd
TD2	288,1	1970,4	19553,7	1598,0	5015,6	32,1	nd	nd	14,5	13,0	nd	nd
TD3	280,1	1199,5	24551,0	2155,3	4052,9	30,8	nd	nd	nd	14,4	nd	10,8
TD4	297,0	723,4	24658,2	875,1	2817,4	37,2	10,7	Nd	nd	17,3	nd	12,8
TD5	274,7	805,8	22674,9	900,4	1904,3	61,1	nd	16,8	15,7	19,8	nd	12,3
TD6	390,2	963,4	25877,0	767,6	4278,8	34,9	nd	13,5	nd	16,5	nd	10,6
TD7	362,1	843,3	24762,1	376,9	3057,5	22,8	nd	13,8	nd	12,8	nd	nd
TD8	248,6	826,7	25733,3	791,0	2235,0	22,1	nd	10,2	nd	12,9	nd	nd
TD9	360,0	1185,6	24896,1	310,5	2435,3	37,9	14,6	12,2	nd	14,9	14,7	nd
TD10	252,7	971,9	26547,0	534,0	4173,9	36,0	20,7	10,6	nd	22,3	nd	12,6
TD11	321,4	822,9	25030,4	447,6	2871,0	20,8	nd	0,0	nd	12,0	nd	12,4
MD1	358,8	943,1	20374,7	619,8	2826,9	38,5	11,9	11,3	nd	16,0	nd	nd
MD2	163,8	879,4	19555,9	851,2	3036,3	40,4	11,6	11,7	nd	17,1	nd	nd
MD3	312,8	944,6	23107,2	317,9	3080,6	18,9	nd	0,0	nd	12,5	nd	nd
MD4	254,8	815,0	18217,0	931,3	2154,6	55,3	11,4	12,6	11,9	17,2	nd	nd
MD5	283,9	873,8	23493,4	786,9	2035,1	37,7	11,1	12,5	nd	14,2	nd	10,3
MD6	424,0	1548,2	22120,4	692,9	3154,4	43,0	nd	12,6	10,0	14,6	nd	12,5
MD7	585,0	763,0	18436,7	1285,5	2019,8	48,0	nd	16,8	12,8	21,0	nd	10,7
MD8	393,8	1024,1	32487,1	911,6	3262,2	47,5	nd	15,0	11,3	17,1	nd	nd
MD9	509,5	758,1	22980,3	528,1	2185,5	36,3	nd	13,4	10,7	16,1	nd	nd
MD10	309,2	781,6	19357,7	706,5	1936,4	28,2	nd	10,6	nd	15,6	nd	nd

*: Sonuçlar iki ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

Çizelge 9. Hıyar örneklerinin elemental kompozisyonu*

Table 9. Elemental composition of cucumber samples

Örnek	Na	Mg	K	Ca	P	Fe	Cu	B	Mn	Zn	Ni	Sn	Al
TH1	278,0	1293,0	22487,0	1269,2	3557,1	64,6	12,7	15,4	nd	23,0	nd	nd	nd
TH2	1106,9	1417,6	2006,9	1434,4	4549,5	87,0	10,9	14,7	14,6	43,5	nd	nd	nd
TH3	1795,9	1817,7	28200,7	3329,9	4911,1	52,9	16,5	20,6	16,9	29,6	nd	nd	nd
TH4	200,6	1146,8	23541,8	1817,9	3487,3	43,5	11,1	16,0	10,8	21,6	11,3	nd	nd
TH5	532,6	1422,9	27033,6	2111,9	4908,6	41,9	Nd	15,2	13,5	24,7	nd	nd	nd
TH6	958,1	2220,8	39763,9	2584,3	5499,8	72,2	18,9	18,9	13,0	38,9	nd	nd	16,9
TH7	180,4	1206,7	17340,5	1733,0	3064,2	42,2	nd	11,9	nd	18,3	nd	nd	nd
MH1	311,3	1403,0	21049,5	1715,4	4121,9	30,3	nd	14,8	11,6	19,4	nd	13,4	nd
MH2	152,2	1104,1	17301,7	1726,7	3824,0	53,5	nd	17,2	29,5	25,2	nd	10,9	nd
MH3	239,2	3443,9	21235,9	1599,5	5162,8	27,7	12,1	14,3	nd	12,0	nd	nd	nd
MH4	243,9	2913,1	23513,2	5760,7	5386,8	31,0	13,2	16,3	11,7	26,6	nd	nd	nd
MH5	997,9	2922,9	38542,3	4094,5	7401,1	78,8	27,1	22,7	29,1	36,5	nd	nd	nd
MH6	384,4	2427,9	34916,3	3961,9	4812,3	47,9	14,8	17,9	11,6	23,1	nd	nd	nd
MH7	180,9	1526,2	17326,6	2203,7	2623,6	39,8	10,1	13,6	nd	26,7	nd	nd	nd
MH8	359,9	2339,6	37114,4	4856,7	6688,8	110,4	20,9	26,3	18,2	34,2	nd	nd	36,1
MH9	582,8	2023,1	16204,3	3274,0	3004,7	73,9	12,1	17,3	18,6	21,4	nd	nd	10,0
MH10	342,6	1602,2	20092,9	2159,3	2950,3	27,1	nd	15,2	16,2	16,5	nd	nd	nd

*: Sonuçlar iki ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

Çizelge 9'da Tekirdağ ve Mamaşa'dan toplanan 17 adet hıyar örneğine ait elemental analiz sonuçları sunulmuştur. Taraması yapılan 26 elementten 13 tanesine ait değerler en az bir hıyar örneğinde LOQ üzerinde tespit edilmiş olup Ni için sadece Tekirdağ'dan temin edilen 4 numaralı örnekte LOQ üzerinde sonuç alınmıştır. Mineral madde (Na, Mg, K, Ca, P, Fe, Cu, B, Mn, Zn, Ni, Sn ve Al) içeriği açısından, iki farklı yöreye ait hıyar örnek grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Arsenik, bizmut, kadmiyum, kobalt, krom, civa, molibden, kurşun, platin, kükürt, antimon, selenyum ve titanyum elementleri, analiz yöntemiyle ulaşılabilen LOQ seviyesinin üzerinde tespit edilmemiştir.

Mattina ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada, toprakta bulunan toksik metal kirliliğinin o toprakta yetiştirilmiş sebzelerde ne ölçüde toksik metal kontaminasyonuna neden olduğunu ICP OES kullanarak tespit etmeye çalışmışlardır. Araştırmada hıyar yetiştirilen toprakların As, Cd, Pb ve Zn miktarları sırasıyla 79,2, 0,38, 327 ve 71 mg kg⁻¹ olarak bulunurken domates yetiştirilen toprakların toksik metal içerikleri yine aynı sıra ile 67,4, 0,28, 252 ve 50 mg kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Araştırma sonunda, bu topraklarda yetiştirilen hıyar bitkisi köklerinde As: 24,3 mg kg⁻¹, Cd: 0,33 mg kg⁻¹, Pb: <10 mg kg⁻¹ ve Zn: 113 mg kg⁻¹, domates bitkisi köklerinde ise As: 15,65 mg kg⁻¹, Cd: 0,83 mg kg⁻¹, Pb: 106 mg kg⁻¹ ve Zn: 182 mg kg⁻¹ sonuçları bulunmuştur. Araştırma domates ile hıyar

bitkilerinde karşılaşılan toksik metal kontaminasyonunda toprak kirliliğinin önemli bir sebep olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye’de (Kayseri) kırsal alan ve kentlerde olmak üzere iki farklı lokasyonda yetiştirilen çeşitli sebzelerde (hıyar, domates, yeşil biber, marul, maydanoz, soğan, fasulye, patlıcan, nane, kabak, bamya) toksik metal seviyelerini karşılaştırmak amacıyla hayata geçirilen bir çalışmada, şehir merkezlerine yakın yerlerde yetiştirilen sebzelerdeki toksik metal yükünün, kırsal kesimde yetiştirilen sebzelere göre önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Toksik metal yükünü tespit etmek amacıyla analitik yöntem olarak ICP OES’in kullanıldığı bu çalışmada sebzelerdeki Cd, Pb ve Zn içeriklerinin limitlerin üzerinde olduğu rapor edilmiştir. Bu bulaşların özellikle son 50 yılda tarımda kullanılan sentetik gübrelerden dolayı kirlenen topraklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Özellikle tarımda sıklıkla kullanılan fosforlu gübrelerin yapımında kullanılan fosfor tuzlarının çoğunlukla Cd kontaminasyonuna sahip olduklarının altı çizilmiştir (Demirezen & Aksoy, 2006).

Sonuç ve Öneriler

Çalışma sonucunda iki farklı bölgeden alınan örneklerde MRL seviyesi üzerinde pestisit etken maddesi tespit edilmemiştir. Ancak özellikle Mamaşa örneklerinde propineb ve acetamiprid kalıntısına rastlanması, bu etken maddeleri içeren pestisitlerin kullanımına işaret etmektedir. Elemental analiz sonuçları incelendiğinde ise kurşun, kadmiyum ve civaya rastlanmaması olumlu bir durumdur. Tekirdağ’dan toplanan örneklerin sonuçları incelendiğinde 11 domates örneğinin altı tanesinde kalay ve bir tanesinde nikel rastlandığı görülmektedir. Yine Tekirdağ’dan toplanan yedi hıyar örneğinin birinde alüminyum ve birinde de nikel rastlanmıştır. Mamaşa örneklerinden elde edilen sonuçlar irdelendiğinde ise on domates örneğinin üç tanesinde kalaya rastlandığı görülmektedir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, örneklerde rastlanan kalıntıların insan sağlığı için risk oluşturacak düzeyde olmadığı anlaşılmakta ve araştırmaya konu olan bölge çiftçilerinin tarımsal üretimdeki bilinç seviyesinin yeterli olduğu düşünülmektedir. Ancak hem tarım yapılan toprak hem de tarımsal üretimde kullanılan su, gübre ve pestisitlerin son üründe kalıntı bırakma riski olduğunu gösteren örnekler olması, iyi tarım uygulamalarının devam ettirilmesi yönünde üreticileri uyarıcı etki yapmalıdır.

Bilgi

Etik Onay Beyanı

Bu makalede insan veya hayvan deneklerle herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle etik onaya gerek duyulmamaktadır.

Yazar Katkı Beyanı

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Finansal Destek

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından

NKUBAP.03.GA.17.101. numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışma Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Kaynaklar

- Ahat Şarkaya, C. (2015). Domates ve biberde ardışık pestisit uygulamasının pestisitlerin parçalanma kinetiğine olan etkisi. [Yüksek Lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi].
- Anonim, (2023a, July). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2022-45504>
- Anonim, (2023b, July). https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en
- Anonim, (2023c, July). <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=15692&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>
- Anonim 2023d. <https://bku.tarimorman.gov.tr/>
- AOAC, 2007. AOAC Resmi Metodu 2007.01 (Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate)
- Arias, L.A., Bojaca, C.R., Ahumada, D.A., Schrevens, E. (2014). Monitoring of pesticide residues in tomato marketed in Bogota, Colombia. Food Control, 35, 213-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.046>
- Aysal, P., Gözbek, K., Artık, N., Tunçbilek, A.S. (1998). Domates ve domates ürünlerindeki chlorpyrifos kalıntısının radyoizotop izleme tekniği ile araştırılması. V. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresi, 20-22 Ekim 1998, Konya, 147-151.
- Balcı, H., Durmuşoğlu, E. (2020). Bitki koruma ürünü olarak biyopestisitler: tanımları, sınıflandırılmaları, mevzuat ve pazarları üzerine bir değerlendirme. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 11, 261-274. <https://doi.org/10.31019/tbmd.807300>
- Balkan, T., & Kara, K. (2019). Tokat ilinde tüketime sunulan domateslerde neonikotinoid grubu insektisitlerin kalıntı düzeylerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi, 8(3), 50-58.
- Balkan, T., Kara, K. (2022). Determination of pesticide residues and risk assessment in some vegetables grown in Tokat province. Plant Protection Bulletin, 62, 26-35. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.1053952>
- Balkan, T. and Kara, K. (2023). Dissipation kinetics of some pesticides applied singly or in mixtures in/on grape leaf. Pest Manag Sci, 79: 1234-1242. <https://doi.org/10.1002/ps.7299>
- Balkan, T., Yağcı, A., & Kara, K. (2024). Dissipation behaviors of deltamethrin, emamectin benzoate and hexythiazox in grape under field conditions. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 59(3), 123-129. <https://doi.org/10.1080/03601234.2024.2308487>
- Balkan, T., Yılmaz, Ö. Efficacy of some washing solutions for removal of pesticide residues in lettuce. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci 11, 143 (2022). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00324-x>
- Berisha, D., Begolli, B., Nuro, A. (2013). Study of organochlorinated pesticide residues and PCBs in vegetable and fruit samples from market in Peja-Kosovo. ILIRIA International Review, 3, 409. <http://dx.doi.org/10.21113/iir.v3i2.138>
- Çakmak Sancar, B., Akhan, M., Öztürk, M., Ergün, Ö. (2022). Pesticide residues in vegetables and fruits from İstanbul by LC-MS/MS. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 26(3), 303-315. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.1063811>

- Demirezen, D. ve Aksoy, A. "2006" Heavy metal levels in vegetables in turkey are within safe limits for cu, zn, ni and exceeded for Cd and Pb. *Journal of Food Quality*, 29, 252–265. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2006.00072.x>
- Durmuşoğlu, E., Çelik, C. 2001. Türkiye’de pestisit kalıntıları üzerinde yapılan çalışmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 25 (1), 65-80.
- Düffus 2002 Düffus, J., H. "2002" Heavy Metals – A Meaningless Term (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 74, No. 5, pp. 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
- Elmastas, A., Umaz, A., Pirinc, V., Aydın, F. (2022). Evaluation as time-dependent of pesticides applied in pre-harvest period of grown vegetables: removal of pesticide residues in the vegetables. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, <https://doi.org/10.1080/03067319.2022.2085040>
- EPA (1996). *Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. Method 3050B*. United States Environmental Protection Agency, USA.
- Evrans, E., Duraklı-Velioglu, S., Velioglu, H. M., & Boyaci, I. H. (2024). Effect of wax separation on macro- and micro-elements, phenolic compounds, pesticide residues, and toxic elements in propolis. *Food Science & Nutrition*, 12, 1736–1748. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3866>.
- Fujito, Y., Tanaka, K., Ogura, T., Arakawa, K., Hayakawa, Y. (2016). Multi-residue analysis of pesticides in agricultural products using QuEChERS and SFC/MS. Shimadzu Corporation, Japan.
- Gölge, Ö., Hepsag, F., Kabak, B. 2018. Health risk assessment of selected pesticide residues in green pepper and cucumber. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.027>
- Hepsağ, F. (2019). Akdeniz Bölgesi’nde Yetiştirilen Domateslerde Pestisit Kalıntı Düzeylerinin Tespiti ve Validasyon Çalışması. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5,76-89. <https://doi.org/10.24180/ijaws.502956>
- Hassan, H., Elsayed, E., El-Raouf, A.E.A., Salman, S.N. 2019. Method validation and evaluation of household processing on reduction of pesticide residues in tomato. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 14:,31-39. <https://doi.org/10.1007/s00003-018-1197-2>
- Jankowska, M., Lozowicka, B., Kaczynski, P. 2019. Comprehensive toxicological study over 160 processing factors of pesticides in selected fruit and vegetables after water, mechanical and thermal processing treatments and their application to human health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 652, 1156-1167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.324>
- Kaya, T., Tuna, A.L. (2019). İzmir ilindeki üç halk pazarından alınan meyve ve sebze örneklerindeki pestisit kalıntı miktarlarının araştırılması. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6, 32-38. <https://doi.org/10.19159/tutad.437474>
- Kazar Soydan, D., Turgut, N., Yalçın, M. et al. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region of Turkey and assessment of risk to consumers. *Environ Sci Pollut Res* 28, 27511–27519 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12580-y>
- Khoshtnam, F., Ziaee, M., Daei, M., Mahdavi, V., Khaneghah, A.M. (2022). Investigation and probabilistic health risk assessment of pesticide residues in cucumber, tomato, and okra fruits from Khuzestan, Iran. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(17),25953-25964. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19041-0>
- Kuscu, I.S.K., Bayrakta, M.K., Tuncer, B. (2022). Determination of Heavy Metal (Cr, Co, and Ni) Accumulation in Selected Vegetables Depending on Traffic Density. *Water Air and Soil Pollution*, 233(6), 224. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-022-05697-4>
- Mattina, M.J.I., LAnnucci-Berger, W. Musante, C. ve White, J.C. "2003" Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution*, 124,375–378. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(03)00060-5)
- Oral, E.V., Tokul-Ölmez, Ö., Yener, İ., Firat, M., Tunay, Z., Terzioğlu, P. (2018). Trace elemental analysis of Allium species by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) with multivariate chemometrics. *Analytical Letters*, 52,320-336. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1460376>
- Özcan, C., Balkan, S. (2017). Multi-Residue Determination of Organochlorine Pesticides in Vegetables in Kırklareli, Turkey by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(7),761-769. <https://doi.org/10.1134/S1061934817070036>
- Özercan, B., Taşçı, R. (2022). Türkiye’de pestisit kullanımının iller, bölgeler ve pestisit grupları açısından incelenmesi. *Ziraat Mühendisliği*, 375,75-88. <https://doi.org/10.33724/zm.1120599>
- Polat, B., Tiryaki, O. (2018). Çanakkale ili açık alan domates yetiştiriciliğinde pestisit kalıntılarının QuEChERS yöntemi ile araştırılması. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6:1, 71-79.
- Polat, B., Tiryaki, O. (2019). Assessing washing methods for reduction of pesticide residues in Capia pepper with LC-MS/MS. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55:1, 1-10. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1660563>
- Polat, B. (2021). Reduction of some insecticide residues from grapes with washing treatments. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 45:1, 125-137. <https://doi.org/10.16970/entoted.843754>
- Püssa, T. (2008). *Principles of food toxicology*. CRC Press. Taylor and Francis
- SANTE (2021). SANTE/11312/2021 Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 1–55. https://www.accredia.it/app/uploads/2021/02/SANTE_11312_2021.pdf. Erişim tarihi: 20.03.2024
- Siddique, Z., Malik, A.U. (2022). Fruits and vegetables are the major source of food safety issues need to overcome at household level (traditional vs. green technologies): A comparative review. *Journal of Food Safety*, 42,e13003. <https://doi.org/10.1111/jfs.13003>
- Sungur, Ş., Tunur, Ç. (2012). Investigation of pesticide residues in vegetables and fruits grown in various regions of Hatay, Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 5,265-267. <https://doi.org/10.1080/19393210.2012.704597>
- Tözün, M., Akar, G. (2022). Türkiye’de gıda numunelerinde pestisit kalıntıları üzerine 2010 yılı sonrası ulusal literatürün incelenmesi. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*, 7,177-91. <https://doi.org/10.35232/estudamhsd.968829>
- Varol, M., Gunduz, K., Sunbul, M.R., Aytıp, H. (2022). Arsenic and trace metal concentrations in different vegetable types and assessment of health risks from their consumption. *Environmental Research*, 206,112252. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112252>
- Yang, M., Wang, Y., Yang, G., Wang, Y., Liu, F., Chen, C. (2024). A review of cumulative risk assessment of multiple pesticide residues in food: Current status, approaches and future perspectives, *Trends in Food Science & Technology*, 144, 104340, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104340>.



Investigation of the Physicochemical, Beneficial Microorganism, and Bioactive Properties of Colostrum Samples from Different Sheep and Goat Breeds: The Case of Burdur Province

Pelin Ertürkmen^{1,a,*}, Türker Atcalı^{2,b}, Esra Uğur Geçer^{3,c}

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur Gıda, Tarım ve Hayvancılık Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Burdur, Türkiye

²Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur Gıda, Tarım ve Hayvancılık Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Burdur, Türkiye

³Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 04.09.2024 Accepted : 30.10.2024</p> <p>Keywords: Colostrum Akkaraman ACE-inhibitor Beneficial Microorganism Antioxidant</p>	<p>In this study, the colostrum samples from six Akkaraman sheep and five Honamlı goats, which are industrially and economically significant breeds widely raised in Burdur (Turkey), were analyzed for their physicochemical and bioactive properties on the 1st, 2nd, and 3rd days after birth, as well as mature milk samples on the 15th day. It was found that sheep colostrum contained higher levels of total protein, dry matter, and fat compared to goat colostrum ($p<0.05$). The beneficial microorganism content in the colostrum samples of both breeds was determined to be above 7 log CFU/mL during the first 3 days after birth. The levels of total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) in the sheep and goat colostrum samples were 8.82-8.03 and 8.52-8.33 log CFU/mL, <i>Bifidobacterium</i> spp. were 8.41-8.12 and 8.15-7.97 log CFU/mL, and <i>Lactobacillus acidophilus</i> were 7.61-6.78 and 7.85-7.61 log CFU/mL, respectively. To measure antioxidant activity, the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation, and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) methods were used. The highest ABTS and TEAC antioxidant values were found on the 1st day in the sheep and goat colostrum samples at 67.44 and 71.32, and 20.76 and 24.65, respectively ($p<0.05$). The highest ACE-inhibitory activity was observed on the 2nd day in sheep colostrum samples at 32.39%, and on the 3rd day in goat colostrum samples at 42.29%. In mature milk samples, a decrease in bioactive properties was observed compared to colostrum samples in both animals. This study showed that the high ACE-inhibitory and antioxidant activity in the colostrum samples of Honamlı goats indicated a good protective ability against the formation of peroxy radicals. This study revealed the value of colostrum from different small ruminant species in terms of bioactive properties and beneficial microorganism content.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2338-2346, 2024

Farklı Koyun ve Keçi Irkları Kolostrum Örneklerinin Fizikokimyasal, Yararlı mikroorganizma ve Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması: Burdur İli Örneği

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 04.09.2024 Kabul : 30.10.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Kolostrum Akkaraman ACE-inhibitör Yararlı Mikroorganizma Antioksidan</p>	<p>Bu çalışmada, Burdur (Türkiye) ilinde endüstriyel ve ekonomik yönden yetiştiriciliği yaygın şekilde yapılan evcil keçi (<i>Capra hircus</i>) ve koyun (<i>Ovis aries</i>) ırklarından olan 6 adet Akkaraman ırkı koyunları ile 5 adet Honamlı ırkı keçilerinin doğum sonrası 1., 2. ve 3. gün kolostrumları ve 15. gün olgun süt örnekleri fizikokimyasal ve biyoaktif özellikler yönünden analiz edilmiştir. Koyun kolostrumunun keçi kolostrumuna kıyasla daha yüksek düzeyde total protein, kurumadde ve yağ içerdiği saptanmıştır ($p<0,05$). İki farklı ırkın kolostrum örneklerinde yararlı mikroorganizma içeriği doğumdan sonraki ilk 3 günlük süre boyunca >7 log kob/mL düzeyinde saptanmıştır. Koyun ve keçi kolostrum örneklerinde sırasıyla; toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) düzeyi 8,82-8,03; 8,52-8,33 log kob/mL, <i>Bifidobacterium</i> spp. 8,41-8,12; 8,15-7,97 log kob/mL ve <i>Lactobacillus acidophilus</i> 7,61-6,78; 7,85-7,61 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitenin ölçülmesinde 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal katyonu, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite tayin (TEAC) yöntemleri kullanılmıştır. ABTS ve TEAC antioksidan değerleri 1.gün alınan koyun ve keçi kolostrum örneklerinde en yüksek düzeyde sırasıyla 67,44; 71,32 ve 20,76; 24,65 değerlerinde belirlenmiştir ($p<0,05$). Koyun kolostrum örneklerinde en yüksek ACE-inhibitör aktivite %32,39 ile 2.gün belirlenirken, keçi kolostrumunda %42,29 ile 3.gün belirlenmiştir. Olgun süt örneklerinde ise her iki hayvan kolostrum örneklerine göre biyoaktif özellik değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada ACE-inhibitör ve antioksidan aktivitenin Honamlı ırkı keçi kolostrum örneklerinde yüksek olması keçi kolostrum örneklerinin peroksil radikallerinin oluşumuna karşı iyi bir koruma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışma, biyoaktif özellikler ve yararlı mikroorganizma içeriği yönünden farklı küçükbaş hayvan türü kolostrumlarının değerlerini ortaya koymuştur.</p>

^a pelin_bozkurt07@hotmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0003-4321-7886>

^c tatcali@mehmetakif.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0002-9420-0155>

^c esra.ugr@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0457-723X>



Giriş

Küçükbaş hayvan sütü üretimi ve tüketimi son yıllarda gittikçe artmaktadır. Bu yüzden hayvancılık ekonomisi, hayvan sağlığı ve refahının geleceği açısından önemli olan küçükbaş hayvan kolostrumu ve sütlerinin içeriği ile kalitesi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar daha değerli hale gelmektedir (Ovet, 2023). Evcil keçi (*Capra hircus*) ve koyun (*Ovis aries*) ırklarından olan Honamlı keçileri ve Akkaraman cinsi koyunlar Türkiye'nin Akdeniz Bölgesinde yetiştiriciliği yaygın şekilde gerçekleştirilen farklı morfolojik ve verimsel özelliklere sahip önemli küçükbaş hayvan ırklarındandır (Elmaz ve ark., 2012; Elmaz ve ark., 2018).

Memelilerin doğum sonrası ilk 5 günlük süreçte meme bezleri tarafından salınan salgı "kolostrum" olarak isimlendirilir ve 15. günden sonra olgun süt halini alır (Minda ve ark., 2015; İlkaç ve ark., 2023). Kolostrum, zengin içeriği sayesinde normal süttten daha koyu renk ve kıvamda olup protein içeriği 3-4 kat daha yüksektir (140-150 g/L) (Korhonen & Pihlanto, 2007). Yeni doğan yavru canlıının beslenmesinde tek doğal immunoglobulin kaynağıdır (Biswas ve ark., 2007; Van ve ark., 2020; de Lima ve ark., 2024). Hastalıklardan ve enfeksiyonlardan koruyabilen antikorlar dışında bağışıklık sistemini aktive eden, bağırsak fonksiyonunu başlatan ve yaşamın ilk günlerinde sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomunun oluşturmasına yardımcı olan birçok biyolojik aktif bileşen içerir. Kolostrumda bulunan *Bifidobacterium* spp., mikroorganizmalar bağışıklık yanıtlarını stabilize etmede kritik bir rol oynar ve özellikle T hücreleri farklılaşması ve proliferasyonu için önemlidir (Chung ve ark., 2012). Bu bakteriler diğer mikroorganizmalarla birlikte IgG emilimini artırır ve bağırsak bariyerinin oluşumuna katkıda bulunur (Godden ve ark., 2012; Suo ve ark., 2012).

Zengin besinsel bileşime ve mikrobiyal bütünlüğe sahip kolostrum hayvan sağlığı ve refahı açısından hayati öneme sahiptir (Miranda ve ark., 2023). Bunun yanında yeni doğan yavrular sınırlı enerji rezervleriyle doğduğundan yeterli miktarda ve kalitede kolostrum almaları önem arz eder. Kolostrumun mikrobiyal kalitesi genellikle toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) ve toplam koliform sayısı kullanılarak değerlendirilir. Buna karşın bazı çalışmalar kolostrumda mikrobiyal yükün endüstriyel kabul edilebilir eşik olan 5,00 log kob/mL TMAB sayısını aştığını göstermektedir (Donahue ve ark., 2012).

Buzağuların bağırsak kolonizasyonunda koliform grubu mikroorganizmaların sayısının mümkün olduğunca düşük olması önemlidir. Mikrobiyal bütünlüğe sahip olmayan kolostrumlarla beslenen buzağularda, besinlerin yetersiz emilimi gibi sağlık problemleri ve anaerobik yararlı suşların kolonizasyonda yavaşlama gözlenebilir (Flint ve ark., 2008; Puppert ve ark., 2020). Yararlı anaerob mikroorganizmalar, koliform grubu bakterilerin de azalmasına katkı sağlamaktadır. 1 ile 3 gün arasındaki ve 3 ile 8 hafta arasındaki buzağular, özellikle *Escherichia coli* ile ilişkili enfeksiyonlara karşı oldukça hassastır (Bashahun & Amina, 2017; Yasir ve ark., 2024). Araştırmacılar *Lactobacilli* ve *Bifidobacterium* ile *Escherichia coli* arasındaki negatif ilişkiyi vurgulamıştır (Malmuthuge ve ark., 2015).

Günümüzde süt proteinleri, antihipertansif, antitrombotik, antimikrobiyal, antioksidan, immünomodülatör, mineral bağlayıcı ve mikrobiyota stimülasyonu gösteren biyoaktif peptitlerin en iyi kaynağı olarak kabul edilmektedir (Korhonen & Pihlanto, 2007). Doğal biyoaktif peptitlerin keşfi, bu peptitlerin düzenli bir diyet ve gıda takviyeleri yoluyla biyofarmasötik biçimde insan sağlığının teşviki için kullanılması açısından yeni fırsatlar sunar (Manninen, 2009). Protein içeriği yüksek olan kolostrumdan, enzimatik aktivite, sindirim enzimleri veya gıda işleme sırasında biyoaktif peptitler üretilebilir (Sharma ve ark., 2011). Özellikle, *Lactobacillus* spp. tarafından yapılan mikrobiyal fermantasyon sayesinde 2 ile 25 amino asit kalıntı uzunluğuna sahip biyoaktif peptitler oluşabilir (Gill ve ark., 2000; Chakrabarti ve ark., 2018). Bunun yanında biyoaktif peptitler patojenik mikroorganizmaların önemli ölçüde azalmasını sağlayabilir (Zhang ve ark., 2016). Özellikle Lactoferricin B gibi antimikrobiyal peptitler, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae* ve *Helicobacter pylori* gibi bakterileri; *Candida albicans* gibi mayaları ve Hepatit C, Herpes simpleks virüsü, Sitomegalovirüs, HIV-1, Polio virüsü ve Rotavirüs gibi virüsleri inhibe edebilir (Farnaud & Evans, 2005). Ayrıca *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria*'nın çoğalması bakteriyemi veya endotoksemi riskinin azaltılmasında rol oynar (Artym & Zimecki, 2015). Bunun yanında artış gösteren laktik asit bakterileri (LAB) gibi yararlı mikroorganizmalar, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri üreterek fermente gıdalar, özellikle süt ürünlerinde, hipertansiyonu düşürmek için insan ve hayvan sağlığına birçok fayda sağlayabilir (Ashok & Aparna, 2017; Jitpakdee ve ark., 2021). Ayrıca, LAB antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik ve kolesterol düşürücü gibi birçok biyoaktif etki sunar (Kashyap ve ark., 2022; Ertürkmen et al., 2023).

Kaliteli ve zengin besinsel içeriğe sahip kolostrum beslenmesi yeni doğan canlılar için oldukça önemlidir. Kolostrumun işlevsel bir gıda olabilirliği ve bağırsak mikrobiyomunun dengesini de koruması gibi konularla ilgili yapılan çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Ayrıca farklı hayvan türlerinde olduğu gibi aynı türün farklı ırklarında da kolostrum bileşimlerinde değişiklikler gözlenebilmektedir. Bu nedenle bu özgün çalışmada Akkaraman ırkı koyunlar ile Honamlı ırkı keçilerin ilk 3 günlük kolostrumları ile 15.gün olgun sütlerinin fizikokimyasal özellikleri, ACE inhibitör ve antioksidan aktivite gibi özellikleri ile kolostrum örneklerinin yararlı mikroorganizma içerikleri belirlenerek koyun ve keçi gibi farklı türlerin kolostrumlarının bazı işlevsel özelliklerini ortaya koymak hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Kolostrum ve Olgun Süt Örnekleri

Çalışmada kullanılan kolostrum sütleri, Burdur ilinde yeni doğum yapmış 6 Akkaraman koyunu ve 5 Honamlı ırkı keçisinden elde edilmiştir. Hayvanların doğumu takiben 1., 2. ve 3. günlerdeki kolostrumu ile 15. gündeki olgun sütleri gerekli hijyenik önlemler alınarak sağılmıştır.

15 mL'lik steril falcon tüplerinin (Fıratmed/Türkiye) içerisine alınan kolostrum ve süt örnekleri +4°C'ye soğutulularak Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Süt Laboratuvarı'na getirilmiştir. Kolostrum ve 15.gün olgun süt örnekleri, koyun ve keçi olarak ayrı ayrı bir şekilde steril kapta birleştirilerek karıştırılmış ve tek bir numune haline getirilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal Analizler

Kolostrum ve süt örneklerinin fizikokimyasal bileşimlerini belirlemek amacıyla pH, yağ (%), kurumadde (%), toplam protein (%) ve kül (%) analizleri yapılmıştır. Kuru madde analizi IDF (1987)'ye göre 105°C'de sabit ağırlığa gelene kadar numunelerin kurutulmasıyla belirlenmiştir. Yağ analizi Gerber yöntemi ile yapılmıştır. pH değerlerinin ölçümü standart pH tampon çözeltileri ile pH Metre (inolab WTW dijital) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Öner ve Aloğlu, 2018). Kül değeri, örneklerin 550 °C'de kül fırınında beyaz renk alana kadar yakılması sonucunda ölçülmüştür (AOAC, 1990). Protein tayini FOSS MilkoScan (FT1- Danimarka) cihazı ile ölçülerek % protein olarak belirlenmiştir.

Kolostrum ve Olgun Süt Örneklerinden Suda Çözünen Ekstrakt Elde Edilmesi

Koyun ve keçi kolostrum ve olgun süt örneklerinin biyoaktif özelliklerini belirlemek amacıyla örneklerden suda çözünür ekstrakt (SÇE) elde edilmiştir. Örneklerden 20 mL alınarak 40°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin pH'sı 1 M HCl ile pH 4,6'ya ayarlanmıştır. Çöken kazeinler, 4°C'de 15 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Süpernatant Whatmann No:113 ile süzümüştür (Öner & Aloğlu, 2018). Elde edilen filtrat (SÇE), kolostrum ve süt örneklerinin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Suda çözünen protein miktarının belirlenmesinde BCA Kit Assay II (BioVision, K813-2500) kullanılmıştır. Numunelerin toplam protein değerinin hesaplanmasında Bovin Serum Albumin (BSA) protein standardı ile çizilen eğri esas alınmıştır.

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitör Aktivitesi

ACE-inhibitör aktivitesi, Cushman & Cheung (1971) tarafından ilk olarak tanımlanan ve daha sonra Meira ve ark. (2012) tarafından modifiye edilen yöntemin değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Bu analiz için örneklerin SÇE'leri 20 µL'lik boş tüplere eklenmiştir. Analizde kullanılan substrat çözeltisi, pH 8,3'te 0,1 M sodyum borat tamponunda (0,3 M NaCl içeren) 5 mM HHL ile çözülerek hazırlanmıştır. İçerisinde örnek bulunan tüplere, hazırlanan substrat çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. Ayrı bir tüpe sadece 100 µL substrat çözeltisi eklenmiş ve kontrol tüpü (tüp A) olarak isimlendirilmiştir. Ardından, tüplerin hepsine 20 µL ACE (0,1 U/mL) eklenmiştir. Ortaya çıkan karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Hippurik asidi ekstrakte etmek için tüplere 1 mL etil asetat eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakikalık bir inkübasyonun ardından, her tüpün üst fazı dikkatlice ayrı bir tüpe aktarılmıştır. Aktarılan sıvı daha sonra 95°C'de 20 dakika kurutulmuştur. Kurutma adımını takiben, tüplere 1 mL distile su eklenmiş ve absorbans 228 nm'de ölçülmüştür. ACE inhibisyonu, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Formül'de A, kontrol tüpündeki ACE ve HHL'nin absorbansını, B ise örnekteki ACE ve HHL'nin absorbansını temsil etmektedir (Munir ve ark., 2020).

$$\%ACE\text{-inhibitör aktivitesi} = (A-B)/A \times 100$$

DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH [2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (%90,0; Sigma Chemicals Co, St, Louis, MO, ABD)] radikal temizleme aktivitesi, Bersuder ve ark., (1998) tarafından bildirilen yöntemle ve Oussaief ve ark. (2020) tarafından yapılan değişikliklerle belirlenmiştir. Bu amaçla, SÇE örneklerinden 1 mL alınmış ve 1 mL DPPH (125 mM) etanol çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışımlar, karanlıkta oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol için, örnek yerine distile su kullanılmıştır. Elde edilen çözeltinin absorbansı, spektrofotometre (Shimadzu UV-1601) kullanılarak 517 nm'de ölçülmüştür (Bersuder ve ark., 1998; Oussaief ve ark., 2020). DPPH radikal temizleme aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Formül'de A_k kontrol abs değerini, A_ö örnek absorbans değerini temsil etmektedir.

$$\%DPPH\text{ radikal temizleme aktivitesi} = [(A_k - A_{\text{ö}})/(A_k)] \times 100$$

ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi

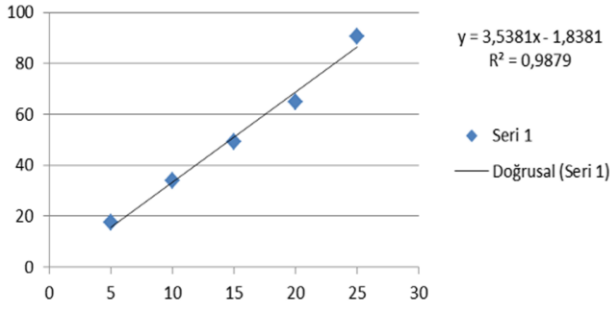
Re ve ark., (1999) tarafından geliştirilen ve Sadat ve ark., (2011) tarafından uyarlanan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, ABTS+• (ABTS—2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit)) radikal katyonu, 7 mmol/L ABTS katyonunun, 45 mmol/L potasyum persülfat içinde çözülmesi ve karışımın oda sıcaklığında karanlıkta 15 saat bekletilmesiyle üretilmiştir. Ardından, ABTS radikal katyon reaktifi, 740 nm'de yaklaşık 0,7 absorbansa ulaşmak için pH 7,4'te 5 mmol/L sodyum fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Radikal, 22°C'de en az 1 saat stabil kalmıştır. SÇE örneklerinden 10 µL alınıp üzerine 1 mL seyreltilmiş ABTS radikal reaktifi ile karıştırılarak 30°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, absorbans 740 nm'de ölçülmüştür. Aynı işlem 5-25 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarda Troloks için uygulanmıştır. Radikal temizleme aktivitesi ile Troloks eğrisinin tüm deneysel noktaları, 3 ölçümün ortalama değerleri ± SD (standart sapma) olarak alınmıştır. %ABTS radikal temizleme aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Formül'de A_b başlangıç abs değerini, A_s son absorbans değerini temsil etmektedir.

$$\%ABTS\text{ radikal temizleme aktivitesi} = [(A_b - A_s)/(A_b)] \times 100$$

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC), belirli bir maddenin serbest radikal temizleme kapasitesini, standart olan Troloks ile karşılaştırarak ölçer. TEAC, aktiviteye karşı konsantrasyon grafiğinin eğiminin, verilen madde için Troloks grafiğinin eğimine oranıdır (Re ve ark., 1999). Troloks standart eğrisi Şekil 1.'de verilmiştir. Sonuçlar µM TEAC/mg olarak ifade edilmiştir.

Kolostrum Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizleri

Keçi ve koyun kolostrum örneklerinden aseptik koşullar altında her grup için Ringer solüsyonu ile 1:9 oranında seyreltmeler hazırlanmıştır. Mikrobiyolojik analizler dökme plak yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Troloks standart eğrisi
Figure 1. Trolox standard curve

Bifidobacterium spp. sayımları, anaerobik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edilen MRS Agar (Merck, Almanya) içerisine 0,5 g/L sistein (L-Cysteine, Sigma-Aldrich) eklenerek gerçekleştirilmiştir (Roy, 2001). *Lactobacillus acidophilus* sayımları, anaerobik koşullarda 37°C'de 72 saat inkübe edilen MRS Agara %10 (v/v) D-sorbitol eklenerek belirlenmiştir (Dave & Shah, 1998). *Lactococcus* sayımları, 30°C'de 48 saat inkübe edilen M-17 Agar (M17, Merck) kullanılarak belirlenmiştir. TMAB, 30°C'de 48 saat inkübe edilen Plate Count Agar (PCA) (Biokar, Fransa) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maya ve küf sayımları, 25°C'de 3-5 gün inkübe edilen, %10 steril laktik asit ile pH'sı $3,5 \pm 0,1$ 'e ayarlanarak asidifiye edilmiş Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçları log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Halkman, 2005).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, Minitab 17 istatistik paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, incelenen örneklerde gruplar arasındaki farkları değerlendirilmiştir. Örneklerdeki günler arası meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Kolostrum Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

Kolostrum ve olgun süt örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre sonuçlar değerlendirildiğinde kolostrum örneklerinin toplam protein, kurumadde ve yağ miktarlarının ilk 3 gün boyunca alınan koyun örneklerinde keçi örneklerine kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Koyun ve keçi örneklerinde sırasıyla toplam protein %11,28-14,10; 10,17-11,21, kuru madde %22,56-25,55; 20,83-22,34 ve yağ değerleri %6,93-7,40; 5,34-5,93 aralığında belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında keçi kolostrum örneklerinin 3 günlük ortalama kuru madde %21,54 ve toplam protein düzeylerinin %10,57; koyun kolostrumlarında ortalama kuru madde %24,17 ve protein düzeyleri %12,93 olarak belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda Saanen ırkı keçilerin kolostrum örneklerinde kuru madde, protein ve yağ düzeylerinin sırasıyla 21,23, 10,24, 7,73 (%) olduğu (Yang ve ark., 2009), aynı özelliklerin Massese ırkı koyunlarda sırasıyla 24,58, 12,44, 8,21 (%) olduğu bildirilmiştir (Martini ve ark., 2012).

Koyun kolostrumunda yapılan bazı çalışmalarda araştırmacılar kurumadde değerlerinin %17,29-28,29; yağ değerinin %6,9-8,6 aralığında olduğunu tespit etmiştir (Kessler ve ark., 2021; Silva ve ark., 2022). Bu çalışmada elde edilen bulguların, araştırmacıların kurumadde ve protein bulgu değerleri ile uyumlu seviyelerde olduğu, buna karşın koyun ve keçilerde yağ değerlerinin araştırmacıların sonuçlarına göre daha düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir. Honamlı keçi kolostrum örneklerinin 1. gün kül değerleri diğer günlere kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Akkaraman koyun kolostrumlarının kül değerleri günler arası istatistiksel bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$). Olgun sütte kül düzeyi her iki ırkta da kolostruma göre azalış göstermiştir ($p < 0,05$). Bu çalışmada kül değerlerinde elde edilen bulgular bazı araştırmacıların kolostrumlardan elde ettiği kül sonuç değerleri ile benzerdir (Kessler ve ark., 2021; Silva ve ark., 2022). Farklı ırklardaki hayvanların laktasyon sayısı (Romero ve ark., 2013), meme hastalıkları (mastitis vb.) (Puppel ve ark., 2020), birey ve mevsim (Duan ve ark., 2024; Westhoff ve ark., 2024), canlılığın beslenme durumu ve ırkı (Zarcu ve ark., 2010) gibi pek çok faktörler kolostrumun kurumadde, protein, yağ ve kül gibi bazı kimyasal bileşim değerlerini etkileyebilir.

Kolostrum, bileşim ve fizikokimyasal özellikler açısından oldukça dinamik ve değişken bir sıvıdır. Olgun süte kıyasla daha fazla düzeyde protein, yağ, antimikrobiyal peptitler, immunglobulinler, büyüme faktörleri vitamin ve mineraller içerir. Fakat normal süte doğru geçtikçe kolostrumun bileşimindeki pek çok değer azaldığı bildirilmektedir (Hernández-Castellano ve ark., 2016; McGrath ve ark., 2016; Polidori ve ark., 2022; Duan ve ark., 2024; Yalçıntaş ve ark., 2024). Bu çalışmada keçi ve koyun kolostrum örneklerinde toplam protein, kurumadde ve yağ düzeyleri 3. gün kolostrum örnekleri ve olgun sütte ilk 2 gün alınan kolostrum örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Sanchez-Macias ve ark., (2014), yaptıkları bir araştırmada kolostrum örneklerinde ilk 3 günde total protein, yağ ve kuru madde düzeylerinin gün ilerledikçe azaldığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde Tekinşen ve Nizamlioğlu (2001), kolostrum örneklerinin protein, kuru madde, yağ ve kül yüzdelerinde 0. saatten itibaren ilk 4 günlük süreçte zaman geçtikçe azalış gösterdiğini bildirmiştir.

Koyun ve keçi kolostrum örneklerinin pH değeri sırasıyla 6,21-6,34; 6,27-6,36 aralığında tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında hem koyun hem de keçilerin 1. gün kolostrumlarının pH düzeyleri 2. ve 3. gün alınan kolostrum örneklerine göre anlamlı şekilde düşük tespit edilmiştir ($p < 0,05$). İki ırkın olgun sütlerinde pH değerleri kolostrum örneklerine göre artış göstermiştir ($p < 0,05$). Bu çalışmada ilk 3 günlük koyun kolostrumlarından elde edilen ortalama 6,28 pH değeri bulgularının, Kumar ve ark., (2017)'in doğumdan itibaren 12 saat arayla ilk 3 gündeki Mapura ve Malwari ırkı koyun cinsi kolostrum örneklerinden elde ettiği pH değerlerinden (6,59 ve 6,54) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu farklılıklar bireysel ve çevresel faktörlerden (laktasyon sayısı, meme hastalıkları, mevsim, canlılığın beslenme durumu, hayvanların ırkı vb.) kaynaklanabilir (Zarcu ve ark., 2010; Romero ve ark., 2013; Duan ve ark., 2024; Westhoff ve ark., 2024).

Tablo 1. Kolostrum ve olgun süt örneklerinin fizikokimyasal özellikleri
 Table 1. Physicochemical properties of colostrum and mature milk samples

Fizikokimyasal Özellikler	Hayvan Türü	Kolostrum örnekleri			Olgun süt
		1. gün	2. gün	3. gün	15. gün
Toplam Protein (%)	Koyun	14,10±0,58 ^{Aa}	13,42±0,31 ^{Aa}	11,28±0,16 ^{Ab}	5,14±0,14 ^{Ac}
	Keçi	11,21±0,10 ^{Ba}	10,34±0,33 ^{Bb}	10,17±0,21 ^{Bb}	4,39±0,15 ^{Bc}
Kuru madde (%)	Koyun	25,55±0,13 ^{Aa}	24,42±0,25 ^{Ab}	22,56±0,07 ^{Ab}	10,58±0,16 ^{Ac}
	Keçi	22,34±0,22 ^{Ba}	20,83±0,35 ^{Bb}	21,47±0,08 ^{Bb}	10,32±0,08 ^{Ac}
Yağ (%)	Koyun	7,40±0,04 ^{Aa}	7,21±0,02 ^{Ab}	6,93±0,03 ^{Abc}	5,98±0,04 ^{Ac}
	Keçi	5,93±0,03 ^{Ba}	5,64±0,01 ^{Bb}	5,34±0,04 ^{Bbc}	5,11±0,03 ^{Bc}
pH	Koyun	6,21±0,02 ^{Bc}	6,30±0,01 ^{Ab}	6,34±0,01 ^{Ab}	6,70±0,03 ^{Aa}
	Keçi	6,27±0,01 ^{Ac}	6,33±0,02 ^{Ab}	6,36±0,02 ^{Ab}	6,74±0,02 ^{Aa}
Kül (%)	Koyun	0,96±0,01 ^{Ba}	0,96±0,01 ^{Aa}	0,94±0,02 ^{Aa}	0,91±0,02 ^{Ab}
	Keçi	1,02±0,01 ^{Aa}	0,98±0,01 ^{Ab}	0,97±0,01 ^{Ab}	0,87±0,04 ^{Bc}

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farkı gösterir (p<0,05); A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farkı gösterir (p<0,05)

Tablo 2. Kolostrum ve olgun süt örneklerinin biyoaktif özellikleri
 Table 2. Bioactive properties of colostrum and mature milk samples

Biyoaktif Özellikler	Hayvan Türü	Kolostrum örnekleri			Olgun süt
		1. gün	2. gün	3. gün	15. gün
ABTS (%)	Koyun	67,44 ±2,06 ^{Ba}	40,86±0,02 ^{Bb}	54,85±0,66 ^{Aab}	38,28±0,21 ^{Bb}
	Keçi	71,32±1,68 ^{Aa}	72,97±1,29 ^{Aa}	52,65±4,13 ^{Ab}	48,16±0,66 ^{Ab}
TEAC (µM TEAC/mg)	Koyun	20,76±0,74 ^{Ba}	12,08±0,04 ^{Bb}	18,34±0,14 ^{Aa}	16,02±1,25 ^{Aab}
	Keçi	24,65±0,28 ^{Aa}	23,72±0,23 ^{Aa}	17,77±0,11 ^{Ab}	17,13±0,08 ^{Ab}
Protein içeriği (mg/mL)	Koyun	12,47±0,33 ^{Ba}	13,95±0,36 ^{Aa}	11,80±0,59 ^{Aa}	10,91±0,90 ^{Aa}
	Keçi	14,90±0,10 ^{Aa}	11,73±2,83 ^{Ab}	10,05±1,77 ^{Ab}	11,59±0,42 ^{Ab}
DPPH (%)	Koyun	52,16±0,62 ^{Ba}	50,31±0,41 ^{Ba}	44,05±0,51 ^{Bab}	32,81±0,64 ^{Bb}
	Keçi	71,05±0,21 ^{Aa}	62,32±0,31 ^{Ab}	49,10±0,31 ^{Ac}	39,84±0,62 ^{Ad}
ACE-inhibitör aktivite (%)	Koyun	27,25±0,77 ^{Ba}	32,39±0,87 ^{Ba}	21,72±1,16 ^{Bab}	15,62±1,32 ^{Bb}
	Keçi	37,92±0,39 ^{Ab}	36,12±0,90 ^{Ab}	42,29±1,16 ^{Aa}	29,70±0,90 ^{Ac}

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farkı gösterir (p<0,05); A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farkı gösterir (p<0,05)

Kolostrum ve Süt Örneklerinin Biyoaktif Özellikleri

Süt ve kolostrum proteinleri, antioksidan, antimikrobiyal, antitrombotik, antiinflamatuvar ve immünomodülatör aktivitelere sahip biyoaktif peptitlerin en iyi kaynaklarından biri olarak kabul edilir (Korhonen, 2010). Kolostrumda çeşitli antioksidanlar, enzimatik (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz) ve enzimatik olmayan proteinler ve peptitler laktoperoksidaz (LPO), laktoferrin (LF) ve serüloplazmin (CP), peynir altı suyu proteini, kazein hidrolizat, fenolik bileşikler ve vitaminler (A ve E) bulunmuştur (Albera & Kankofer, 2009). Bu çalışmada farklı küçükbaş hayvan türlerin kolostrum ve olgun süt örneklerinin biyoaktif özelliklerini belirlemek için elde edilen SÇE örneklerinin protein içeriği Tablo 2’de verilmiştir.

Koyun ve keçi SÇE örneklerinin protein içeriği sırasıyla %13,95-10,91 ile %14,90-10,05 arasında değişmiştir. Honamlı keçilerinin 1.gün SÇE örneklerinin protein içeriği koyunlardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05). Kolostrumların 2. ve 3. günü ile 15.günkü olgun süte ait SÇE örnekleri arasında hayvan türü bazında önemli bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). Koyun SÇE örnekleri arasında günler arası önemli farklılık görülmemiştir (p>0,05). Keçi SÇE örneğinde yalnızca 2.günde düşüş olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Akkaraman koyunu ve Honamlı keçisinin kolostrum örneklerinin biyoaktif özelliklerine ait sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir. Koyun ve keçi kolostrum örneklerinin ABTS

radikal temizleme aktivitesi sırasıyla %67,44-38,28 ile %72,97-48,16 arasında değişmiştir. TEAC antioksidan aktivitesi ise koyun ve keçi kolostrumları için sırasıyla 20,76-12,08 ile 24,65-17,13 µM TEAC/mg arasında değişmiştir. Söz konusu bu iki antioksidan aktivitesinin 3.gün kolostrum örnekleri haricinde keçi sütünde koyun sütüne göre daha yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). Troloks eşdeğeri en yüksek değerler, örneğin peroksil radikallerin oluşumuna karşı koruma yeteneğinin iyi olduğunu ve dolayısıyla potansiyel olarak yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. DPPH radikal temizleme aktivitesi koyun ve keçi örneklerinde sırasıyla %52,16-32,81 ve %71,05-39,84 arasında değişmiş ve tüm kolostrum örnekleri ile 15.günkü olgun süt örneğinde keçinin daha yüksek değer gösterdiği belirlenmiştir.

Hem koyun hem de keçilerin 1.gün kolostrum örneklerinde antioksidan parametrelerin tümünün en yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (p<0,05). Keçi sütünün daha yüksek antioksidan aktivite göstermesi literatür ile uyumludur (Kalyan ve ark., 2021). En düşük antioksidan aktiviteyi keçi örnekleri için 15.gün olgun süt örnekleri göstermiştir. Koyun örneklerinde ise en düşük ABTS ve DPPH radikal temizleme aktivitesini 15.gün olgun süt örneği gösterirken, en düşük TEAC antioksidan aktivitesini 12,08 µM TEAC/mg ile 2.gün kolostrum örneği göstermiştir (p<0,05). Elde edilen bulgulara benzer olarak McGrath ve ark. (2016) kolostrumun antioksidan kapasitesinin, olgun süte kıyasla daha yüksek olduğunu,

bunun nedeninin A (retinol), E (tokoferol) ve C vitaminleri gibi anti-stres vitaminlerinin kolostrumda normal sütte daha yüksek seviyelerde bulunmasından kaynaklandığını bildirmiştir.

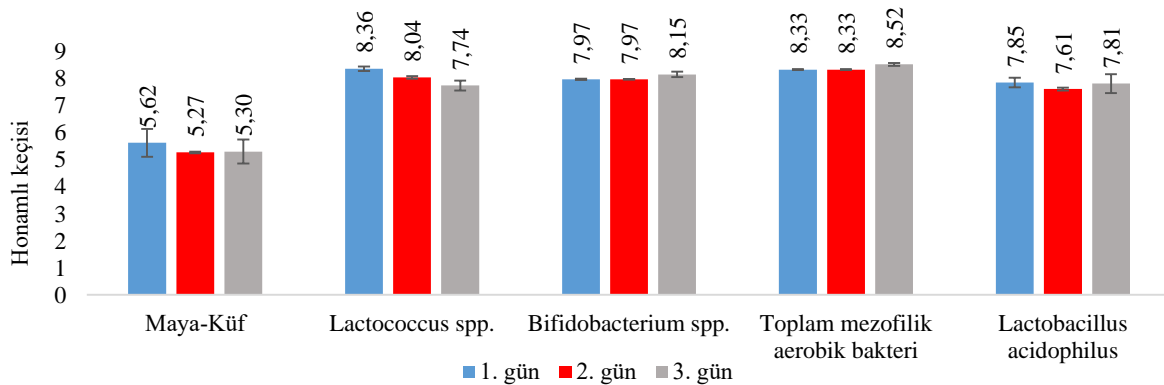
ACE-inhibitör peptitler, vücuttaki kan basıncını düzenleme yeteneğine ve antihipertansif etkiye sahip olan peptitlerdir. Bu nedenle ACE-inhibitörleri, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ile kan basıncını kontrol eder (Fu ve ark., 2016). Bu peptitler, bilinen sentetik ACE-inhibitör maddelere kıyasla doğal olarak proteinlerin hidrolizi ile elde edilmekte ve hipertansiyonu kontrol etmek için odaklanılan nutrasötik alternatiflerden birisi olmuştur. Protein yönünden miktar ve çeşit olarak zengin bir gıda olan süt ve süt ürünleri, ACE-inhibitör peptit eldesi açısından üzerinde sıklıkla çalışılan gıdaların başında gelmektedir. Kolostrumun ise içeriğinde yoğun olarak bulunan β -laktoglobulin gibi serum proteinleri yolu ile ACE-inhibitör etkiyi arttırdığı bilinmektedir (Rohit ve ark., 2012; Ashok & Aparna, 2017). Koyun ve keçi örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite sonuçları Tablo 2’de verilmiştir. ACE-inhibitör aktivite koyun ve keçi kolostrum örneklerinde sırasıyla %32,39-15,62 ile %42,29-29,70 arasında değişmiştir. Koyun örneklerinde en yüksek ACE-inhibitör aktiviteyi 2.gün kolostrumu gösterirken zamanla bu değerin azaldığı görülmüş ve en düşük değeri 15.gün olgun keçi sütü göstermiştir ($p<0,05$). Keçi örneklerinde ise 1. ve 2.gün kolostrumlarında önemli bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). En düşük değeri %29,70 ile 15.gün olgun sütünde gösterdiği tespit edilmiştir. Örnekler hayvan bazında değerlendirildiğinde keçi kolostrum örnekleri ile 15.günkü olgun süt örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin, koyuna ait örneklerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Elde edilen farklı hayvan türlerine ait bulgular Sousa ve ark. (2019)’ın çalışma sonuçları ile benzerdir. Her iki hayvan türü için 15. gün olgun süt örneklerinde kolostruma göre biyoaktivitede düşüş olması, kolostrumun biyolojik yönden değerini ortaya koymuştur.

Kolostrum Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

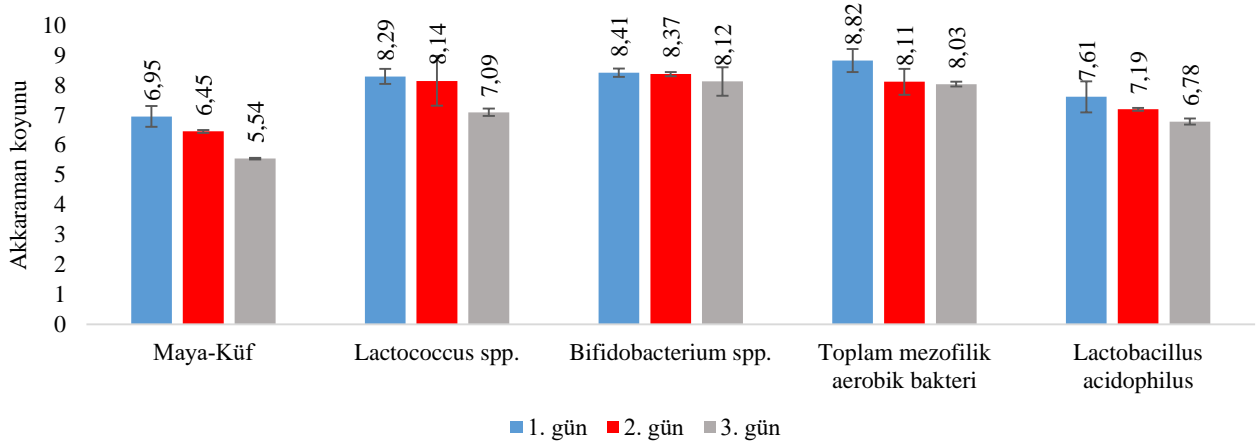
Koyun ve keçi kolostrum örneklerinde sırasıyla TMAB düzeyi içerikleri 8,03-8,82; 8,33-8,52 log kob/mL ve laktokok içerikleri 7,09-8,29; 7,74-8,36 log kob/mL; probiyotik özellikleriyle bilinen *L. acidophilus* içerikleri

sırasıyla 6,78-7,61; 7,61-7,85 log kob/mL ve *Bifidobacterium* spp. düzeyi sırasıyla 8,12-8,41; 7,97-8,15 log kob/mL değişim aralığında tespit edilmiştir. Maya-küf içeriği iki farklı türde de 5-6 log kob/mL değişim aralığında belirlenmiştir (Şekil 2 ve Şekil 3).

Mikrobiyal bütünlüğe sahip kolostrumlar bağırsakta kompleks maddelerin biyoaktif maddelere dönüşümünden, anaerobik veya seçici anaerobik bakteriyel suşların gelişiminden sorumludurlar (Puppet ve ark., 2020). Bir buzağının yaşamının ilk üç günü içinde kolostrum ve rumendeki mikrobiyal değişiklikler çok hızlı bir şekilde değişebilir. En belirgin değişiklikler aerobik bakterilerin azalması ve anaerobik bakterilerin artışıdır (Puppet ve ark., 2020). Bu çalışmada farklı hayvan türlerinden alınan kolostrumlarda yaşamın 1. günden 3. güne kadar alınan örneklerde *Lactobacilli* ve *Bifidobacterium* cinsi türlerin gelişimi oldukça yüksek düzeyde belirlenmiştir (>8 log kob/mL). İlk gün alınan koyun kolostrum örneklerinde *Bifidobacterium* spp, TMAB ve maya- küf sayısı keçi kolostrum örneklerine kıyasla daha yüksek düzeyde saptanmıştır. *L. acidophilus* düzeyi ilk 3 gün boyunca keçi türlerinden alınan kolostrum örneklerinde koyun kolostrumuna kıyasla daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Araştırmacılar farklı ırkların bileşimlerinde kullanılan yem, hayvanın stres ve sağlık durumu, hayvanın ırkı, mevsimsel ve çevresel faktörler gibi bazı parametrelerin kolostrumun mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olabileceğini bildirmiştir (Karlıdağ, 2020; Yasir ve ark., 2024). Bu mikroorganizmaları içeren postnatal dönemdeki birincil popülasyonların gelişim dinamikleri, yetişkin hayvanların rumen mikrobiyotasının oluşumu için de ayrıca çok önemlidir. Bazı araştırmacılar rumen sıvısında yaşamın ikinci gününde anaerobların sayısının 9,0 log kob/mL (Jami ve ark., 2013; Puppet ve ark., 2020) düzeyine ulaşabileceğini bildirmektedir. Minato ve ark. (1992) bir buzağının yaşamının ilk gününde toplam anaerobik bakterileri düzeyinin 8,3 log kob/mL ve yedinci günde 9,3 log kob/mL düzeyine ulaştığını bildirmiştir. Aynı zamanda sadece bağırsak mikroflorasının kompozisyonu üzerinde değil, yemden yararlanmayı artırarak ağırlık artışı da olumlu yönde etkilediği ve ishal riskini azalttığı belirtilmektedir (Lopez ve Heinrichs, 2022; Ceniti ve ark., 2022).



Şekil 2. Honamlı keçisi kolostrum örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri
Figure 2. Microbiological properties of Honamlı goat colostrum samples



Şekil 3. Akkaraman koyunu kolostrum örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri
Figure 3. Microbiological properties of Akkaraman sheep colostrum samples

Araştırma Sonucu ve Öneriler

Kolostrum, antikorlar ve bağışıklık uyarıcı biyoaktif bileşenler açısından zengin bir kaynaktır. Aynı zamanda, yeni doğan yavrunun sindirim sisteminde yararlı mikroorganizmaların hızlı çoğalmasını sağlayan bir faktördür. Bu çalışmada keçi ve koyun türlerinin doğumdan sonraki ilk 3 günlük kolostrumu ve 15. gün olgun sütlerinin biyoaktif ve fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Yararlı mikroorganizma içerikleri ise hayvanların 3 günlük kolostrumlarında belirlenmiştir. Ruminant hayvan türlerine ait kolostrumlar arasında farklılıklar bulunduğu ve bu kapsamda koyun kolostrumunun keçi kolostrumuna kıyasla daha yüksek düzeyde total protein, kurumadde ve yağ içerdiği belirlenmiştir. Koyun ve keçi kolostrum türlerinden olan hayvanların doğumundan sonra ilk gün alınan kolostrum örneklerinin, 15. gün alınan olgun süt örneklerine göre daha yüksek suda çözünen protein ve biyoaktif bileşen özellikler göstermesi kolostrumun biyolojik yönden değerini ortaya koymuştur. Keçi kolostrumun, koyun kolostrumuna ve olgun süt örneklerine göre biyoaktif özelliklerinin daha yüksek olması, keçi sütünün özellikle kolostrum fazında iken biyolojik yönden önemini göstermektedir. İlk gün alınan kolostrum örneklerinde daha yüksek düzeyde *Lactobacilli* ve *Bifidobacterium* spp. gibi yararlı mikroorganizma ve biyoaktif özellik içeriğinin belirlenmesi kolostrumun yüksek mikrobiyolojik kalitesi ile işlevsel özellikleri arasındaki olumlu ilişkiyi doğrulamıştır. Bu çalışma ışığında kolostrum, yavru beslenmesindeki bilinen öneminin yanı sıra biyoaktif özelliği yüksek ve yararlı mikroorganizmalar yönünden zengin olması ile çeşitli nutrasötik çalışmalara da potansiyel kaynak sağlayabilir.

Bilgi

Teşekkür

Bu çalışma, Prof. Dr. Zübeyde Öner'in katkılarıyla Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Süt Teknolojisi ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur Gıda Tarım ve Hayvancılık Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Laboratuvarlarının imkanlarıyla gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Albera, E., & Kankofer, M. (2009). Antioxidants in colostrum and milk of sows and cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 606–611. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01027.x>
- Artym, J., & Zimecki, M. (2005). Rola laktoferriny w prawidłowym rozwoju noworodka The role of lactoferrin in the proper development of newborns. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59, 421–432.
- Ashok, N. R., & Aparna, H. S. (2017). Empirical and bioinformatic characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) colostrum whey peptides & their angiotensin I-converting enzyme inhibition. *Food Chemistry*, 228, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.007>
- AOAC, (1990). "Official Methods of Analysis". 15 th ed., Arlington, VA.
- Bashahun, G. M., & Amina, A. (2017). Colibacillosis in Calves: A review of literature. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2, 62–71. <https://doi.org/10.31248/JASVM2017.041>
- Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(2), 181–187.
- Biswas, P., Vecchi, A., Mantegani, P., Mantelli, B., Fortis, C., & Lazzarin, A. (2007). Immunomodulatory effects of bovine colostrum in human peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiologica*, 30, 447–454.
- Ceniti, C., Costanzo, N., Morittu, V. M., Tilocca, B., Roncada, P., & Britti, D. (2022). Review: Colostrum as an Emerging food: Nutraceutical Properties and Food Supplement. *Food Reviews International*, 39(7), 4636–4664. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2034165>
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1738. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- Chen, B., Tang, G., Guo, W., Lei, J., Yao, J., & Xu, X. (2021). Detection of the core bacteria in colostrum and their association with the rectal microbiota and with milk composition in two dairy cow farms. *Animals (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ani11123363>
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., & Troy, E. B. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149, 1578–1593.

- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- de Lima, T. C., de Sobral, G. G., de França Queiroz, A. E. S., Chinelate, G. C. B., Porto, T. S., Oliveira, J. T. C., & Carneiro, G. F. (2024). Characterization of lyophilized equine colostrum. *Journal of Equine Veterinary Science*, 132, 104975. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104975>
- Donahue, M., Godden, S., Bey, R., Wells, S., Oakes, J., Sreevatsan, S., ... & Fetrow, J. (2012). Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations. *Journal of Dairy Science*, 95, 2697–2702. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5184>
- Donnet-Hughes, A., Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., ... & Schiffrin, E. J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(4), 407–415. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001898>
- Duan, H., Sun, Q., Chen, C., Wang, R., Yan, W. (2024). A review: The effect of bovine colostrum on immunity in people of all ages. *Nutrients*, 16(13), 2007. <https://doi.org/10.3390/nu16132007>
- Elmaz, Ö., Dağ, B., Saatci, M., Aktaş, H. A., Mamak, N., & Gök, B. (2012). The determination of some morphological characteristics of Honamlı goat and kids, defined as a new indigenous goat breed of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(3): 481–485. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5767>
- Elmaz, Ö., Ağaoğlu, Ö. K., Akbaş, A. A., Saatçi, M., & Metin, M. Ö. (2018). The present conditions of sheep farms in Burdur province in the Mediterranean region of Turkey. 1st international symposium on silvopastoral systems and nomadic societies in Mediterranean countries, ISNOS-MED, 37–41.
- Erdem, H., Atasever, S. (2005). Yeni doğan buzağılarda kolostrumun önemi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2), 79-84.
- Farnaud, S., & Evans, R. W. (2005). Lactoferrin: The conductor of the immunological system? In *Lactoferrin: The conductor of the immunological system?* Nova Science Publishers. [https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/publications/lactoferrin-the-conductor-of-the-immunological-system\(d71622ca-a367-48b5-87a9-5dc981c89933\)/export.html](https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/publications/lactoferrin-the-conductor-of-the-immunological-system(d71622ca-a367-48b5-87a9-5dc981c89933)/export.html)
- Flint, H. J., & Bayer, E. A. (2008). Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 280–288. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.022>
- Fu, Y., Young, J. F., Rasmussen, M. K., Dalsgaard, T. K., Lametsch, R., Aluko, R. E., & Therkildsen, M. (2016). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. *Food Research International*, 89, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.037>
- Godden, S. M., Smolenski, D. J., Donahue, M., Oakes, J. M., Bey, R., Wells, S., Sreevatsan, S., Stabel, J., & Fetrow, J. (2012). Heat-Treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *Journal of Dairy Science*, 95, 4029–4040. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5275>
- Halkman A. K. (2005). Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. *Başak Matbaacılık*, 358s.
- Hamouda, R. H., Thannaa, K. H., & Nabih, A. M. (2010). Bacteriological and pathological studies on some aerobic and anaerobic bacteria causing diarrhoea in camel calves. *Veterinary Medicine Journal Giza*, 58, 177–197.
- Hernández-Castellano, L. E., Almeida, A. M., Castro, N., & Argüello, A. (2014). The colostrum proteome, ruminant nutrition, and immunity. *Current Protein & Peptide Science*, 15(1), 64–74. <https://doi.org/10.2174/138920371501140114103637>
- Hernández-Castellano, L. E., Almeida, A. M., Renaut, J., Argüello, A., Castro, N. (2016). A proteomics study of colostrum and milk from the two major small ruminant dairy breeds from the Canary Islands: A bovine milk comparison perspective. *Journal of Dairy Research*, 83(3), 366-374. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000273>
- IDF, (1987). Determination of total solids content. IDF Standard 21B. Brussels, Belgium: International Dairy.
- İlkaç, H. Y., Aktaş, Ş., Güldemir, H. H., Semerci, S. Y., Batirel, S., & Garipağaoğlu, M. (2023). Kolostrum ve olgun anne sütünün makro besin ögesi bileşimini etkileyen maternal faktörler. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 51(1), 9–17. <https://doi.org/10.33076/2023.BDD.1726>
- International Dairy Federation (IDF). (1987). Determination of total solids content (IDF Standard 21B).
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the Bovine Rumen Bacterial Community from Birth to Adulthood. *ISME Journal*, 7, 1069–1079. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>
- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., & Nitoda, T. (2021). Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 135, Article 110061. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110061>
- Kalyan, S., Meena, S., Kapila, S., Yadav, R., & Deshwal, G. K. (2021). In vitro assessment of antioxidative potential of goat milk, casein and its hydrolysates: Comparison of goat milk with bovine and buffalo milk. *Research Square*, 1–19. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-546200/v1>
- Karlıdağ, M. (2020). Kolostrum: farmakolojik, nutrasötikal ve fonksiyonel özellikleri. *Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*
- Kashyap, R., Narayan, K. S., & Vij, S. (2022). Identification of antibacterial and immunomodulatory bioactive peptides generated from buffalo (*Bubalus bubalis*) colostrum whey fermented by *Lactobacillus rhamnosus* C25: LC-MS/MS-based analysis. *Journal of Functional Foods*, 95, 105158. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105158>
- Kessler, E. C., Bruckmaier, R. M., Gross, J. J. (2021). Comparative estimation of colostrum quality by Brix refractometry in bovine, caprine, and ovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 2438–2444. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19020>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829–843. <https://doi.org/10.2174/138161207780363112>
- Korhonen, H. J. (2010). Health-promoting proteins and peptides in colostrum and whey. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 1, 151–168. <https://doi.org/10.1002/9780813811048.ch11>
- Kumar, H., Kumar, S., Kumar, K. (2017). Chemical and immunological quality of sheep colostrum: effect of breed. *Human Health and Nutrition*, 67, 48–53.
- Lopez, A. J., & Heinrichs, A. J. (2022). Invited review: The importance of colostrum in the newborn dairy calf. *Journal of Dairy Science*, 105(4), 2733–2749. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20114>
- Malmuthuge, N., Griebel, P. J., & Guan, L. L. (2015). The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 36. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00036>
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F. (2012). The lipid component of Massese ewes' colostrum: Morphometric characteristics of milk fat globules and fatty acid profile. *International Dairy Journal*, 24(2), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.07.006>

- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L., & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science & Technology*, 96, 133–158. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Correa, A. F. P., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.011>
- Minato, H., Otsuka, M., Shirasaka, S., Itabashi, H., & Mitsumori, M. (1992). Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *Journal of General and Applied Microbiology*, 38, 447–456. <https://doi.org/10.2323/jgam.38.447>
- Minda, H., Kovács, A., Funke, S., Szász, M., Burus, I., Molnár, S., ... & Decsi, T. (2004). Changes of fatty acid composition of human milk during the first month of lactation: a day-to-day approach in the first week. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 48(3), 202–209. <https://doi.org/10.1159/000079821>
- Miranda, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2023). Bovine colostrum: Human and animal health benefits or route of transmission of antibiotic resistance-One Health perspective. *Antibiotics*, 12(7), Article 156. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071156>
- Munir, M., Nadeem, M., Mahmood Qureshi, T., Gamlath, C. J., Martin, G. J. O., Hemar, Y., & Ashokkumar, M. (2020). Effect of sonication, microwaves, and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105–140. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2020.105140>
- Oussaief, O., Jrad, Z., Adt, I., Dbara, M., Khorchani, T., & El-Hatmi, H. (2020). Antioxidant activities of enzymatic-hydrolysed proteins of dromedary (*Camelus dromedarius*) colostrum. *International Journal of Dairy Technology*, 73, 333–340. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12709>
- Ovet, C. (2023). Colostrum induced passive immune transfer in lambs. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 7(2), 80–88. <https://doi.org/10.30704/http-www-jivs-net.1335313>
- Öner, Z., & Aloğlu, H. Ş (2018). Süt ve Süt Ürünleri Analiz Yöntemleri. Sidas Medya Ltd. Şti., Çankaya, İzmir.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>
- Polidori, P., Rapaccetti, R., Klimanova, Y., Zhang, J. J., Santini, G., & Vincenzetti, S. (2022). Nutritional parameters in colostrum of different mammalian species. *Beverages*, 8(3), 54. <https://doi.org/10.3390/beverages8030054>
- Puppel, K., Gołębiewski, M., Grodkowski, G., Solarczyk, P., Kostusiak, P., Klopčić, M., & Sakowski, T. (2020). Use of somatic cell count as an indicator of colostrum quality. *Plos One*, 15(8), e0237615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237615>
- Puppel, K., Gołębiewski, M., Konopka, K., Kunowska-Słószarz, M., Słószarz, J., Grodkowski, G., ... & Sakowski, T. (2020). Relationship between the quality of colostrum and the formation of microflora in the digestive tract of calves. *Animals*, 10(8), 1293. <https://doi.org/10.3390/ani10081293>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rohit, A. C., Sathisha, K., & Aparna, H. S. (2012). A variant peptide of buffalo colostrum β -lactoglobulin inhibits angiotensin I-converting enzyme activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.057>
- Romero, T., Beltrán, M. C., Rodríguez, M., De Olives, A. M., & Molina, M. P. (2013). Goat colostrum quality: Litter size and lactation number effects. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7526–7531. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6900>
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69(3), 167–182. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00496-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00496-2)
- Sadat, L., Çakir-Kiefer, C., N'Negue, M. A., Gaillard, J. L., Girardet, J. M., & Miclo, L. (2011). Isolation and identification of antioxidant peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(4), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.011>
- Sánchez-Macias, D., Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-delaNuez, A., Argüello, A. (2014). From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 10–16. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6811>
- Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: A review. *International Journal of Bioautomation*, 15, 223–250.
- Silva, J. A. G., Silveira, M. D. M., Leão, P. V. T., Cunha, J. V. T. D., Dias, M. B. D. C., Lima, M. S. D., Silva, M. A. P. D. (2022). Chemical profile colostrum, quality refrigerated and frozen milk of santa inês sheep. *Ciência Rural*, 52(8), e20200986. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200986>
- Sousa, Y. R., Medeiros, L. B., Pintado, M. M. E., & Queiroga, R. C. (2019). Goat milk oligosaccharides: Composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties. *Trends & Technology*, 92, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.052>
- Suo, C., Yin, Y., Wang, X., Lou, X., Song, D., Wang, X., & Gu, Q. (2012). Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on Pig Growth and Pork Quality. *BMC Veterinary Research*, 8, 89.
- Tekinşen, O.C. Nizamlioğlu M. 2001. Süt Kimya, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Birinci baskı, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 18–19–128–129.
- Turkish Standards Institution. (1978). Peynirde yağ miktarı tayini (Van Gulik Metodu). Turkish Standards Institution.
- Westhoff, T. A., Borchardt, S., Mann, S. (2024). Nutritional and management factors that influence colostrum production and composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 107(7), 4109–4128. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24349>
- Van, H. I., Goossens, K., Vandaele, L., & Opsomer, G. (2020). Invited review: MicroRNAs in bovine colostrum-focus on their origin and potential health benefits for the calf. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16959>
- Yalçıntaş, Y. M., Duman, H., Rocha, J. M., Bartkiene, E., Karav, S., & Ozoğul, F. (2024). Role of bovine colostrum against various diseases. *Food Bioscience*, 61(104818), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104818>
- Yang, X., Chen, J., & Zhang, F. (2009). Research on the chemical composition of Saanen goat colostrum. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 500–504. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00515.x>
- Yasir, M., Al-Zahrani, I. A., Khan, R., Soliman, S. A., Turkistani, S. A., Alawi, M., & Azhar, E. I. (2024). Microbiological risk assessment and resistome analysis from shotgun metagenomics of bovine colostrum microbiome. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(4), 103957. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103957>
- Zarcula, S., Cernescu, H., Mircu, C., Tulcan, C., Morvay, A., Baul, S., & Popovici, D. (2010). Influence of breed, parity and food intake on chemical composition of first colostrum in cow. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 154–154.
- Zhang, L. J., Sen, G. L., Ward, N. L., Johnston, A., Chun, K., Chen, Y., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptide LL37 and MAVS signaling drive interferon- β production by epidermal keratinocytes during skin injury. *Immunity*, 45(1), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.021>



The Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Pumpkin, Rosehip and Pomegranate Seeds

Sena Bakır^{1,2,a,*}

¹Department of Gastronomy and Culinary Arts, Faculty of Tourism, Recep Tayyip Erdogan University, Ardesen, Rize, Türkiye

²Blueberry Application and Research Center, Recep Tayyip Erdogan University, Rize, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Research Article

Received : 25.09.2024

Accepted : 05.12.2024

Keywords:

Food waste

Phenolics

Bioactive components

HPLC-PDA

Antioxidant activity

Food waste is a significant problem worldwide. These food wastes, often discarded without any preliminary processing, can be rich in bioactive substances. In this study, the aim was to identify the phenolic compounds in pumpkin, rosehip and pomegranate seeds, which are frequently consumed in winter. For this purpose, ultrasonically assisted methanolic extracts were prepared from seeds separated from other waste parts (such as shells, stems, and leaves). The results indicated that pomegranate seeds had the highest total phenolic content, with 45.6 ± 3.1 mg GAE/g sample ($P < 0.05$). Similarly, pomegranate seeds also showed the highest total antioxidant capacity in both CUPRAC (114.7 ± 2.6 mg torolox/g sample) and DPPH (71.2 ± 3.8 mg torolox/g sample) analyses ($P < 0.05$). In phenolic profiling analysis using HPLC-PDA, syringic acid was the most abundant compound in pumpkin seeds, (-)-catechin in rosehip seeds, and punicalagin derivatives in pomegranate seeds.

sena.bakir@erdogan.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0002-6258-1969>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Food waste, including leftovers and pre-cooked food, is a biodegradable material generated from a various source, such as homes, hotels, and food processing industries. Utilizing waste and byproducts from food processing and underutilized agricultural products, has recently gained increased attention. A significant amount of food resources or industrial food residues could be preserved if these materials, or even portions of them, are converted into new products. Such applications help maximize the available resources and contribute to creating a variety of new foods, feed, fertilizer, medicine and cosmetics. Maximizing the nutritional and industrial potential of waste, underutilized agricultural products, and byproducts is crucial. Consequently, this can lead to a substantial reduction in waste disposal.

Fruit waste, a major source of municipal waste, contains natural bioactive compounds (Deng et al., 2012). Although synthetic bioactive compounds are approved for food use in many countries, consumer acceptance is declining. As a result, there is a growing interest in using natural bioactive compounds instead of synthetic ones

(Nieto et al., 2023). Recent studies have shown that various fruit and vegetable by-products are an ideal source of bioactive compounds, which can be reintroduced into the food chain as natural additives or within food matrices to create functional foods and nutraceuticals (Vilas-Boas et al., 2021). For instance, grape seed and peel extracts positively impact human health, offering benefits such as anti-inflammatory effects, hyperglycemia prevention through improved insulin sensitivity, and radioprotective properties (Vodnar et al., 2017). The peel, seeds, leaves, and pomace from blueberries are also rich sources of anthocyanins, flavonoids, and phenolic acids (Tylewicz et al., 2018). In this regard, winter fruits like pomegranate, rosehip, and pumpkin have substantial potential applications.

In Türkiye, 1001 tons of organic rose hips were produced on 47998 decares of land (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2022a), while the total amount of pumpkin production was recorded as 744300 tons in 2022 (FAO, 2024), and pomegranate production is carried out on approximately 300 thousand decares of land and the

amount of pomegranate production was determined as 600021 tons (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2022b). In a study examining the amount of agricultural waste in Türkiye, it was recorded that among the horticultural crops grown in our country, pomegranate fruit has a production volume of 537847 tons and 8745 tons of it is waste, similarly, 21802 tons of waste is generated from 87207 tons of pumpkin production (Ünlü et al., 2023)

Rosehip (*Rosa canina L.*), a member of the *Rosaceae* family, is widely distributed geographically (Chrubasik et al., 2007). Rosehip seeds contain phytochemicals such as carotenoids (2.92 µg/g), phenolic compounds (2554 µg/g), and ascorbic acid (1798 µg/g). Moreover, rosehip-seed oil is rich in polyunsaturated fatty acids (Ilyasoğlu, 2014). Rosehip is valued in various production processes due to its numerous nutritional and health benefits, including its use in treating infections, inflammatory illnesses, flu, chronic pain and in skin care and antiulcer therapies (Guimarães et al., 2010). The pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) is commonly used in traditional medicine and as a food source. Its plant extracts, derived from various parts, exhibit a wide range of biological activities, including antibacterial, antidiabetic, anticancer, hypocholesterolemic, antioxidant, immunomodulatory, antimutagenic, anthelmintic, and anti-bladder stone properties (Krimmer-Malešević, 2020). Pumpkin seeds contain essential nutrients, including ash (4.1–5.27%), fiber (2.3%), micro- and macroelements, fats (38–49%) and protein (25.9–35.5%), and omega-3 and omega-6 fatty acids (Karaş et al., 2024). Although often discarded, pumpkin seeds are high in fatty acids and amino acids, which can enhance food flavor when used as an ingredient or byproduct (Lemus-Mondaca et al., 2019). Pomegranates (*Punica granatum L.*), with over 500 cultivars available globally (Passafiume et al., 2019) are known in traditional medicine for their antibacterial, antifungal, antiviral, antiinflammatory, anthelmintic, and antioxidant compounds (Viuda-Martos et al., 2010). Pomegranates are most consumed raw or in fruit juices, jellies, and jams (Alexandre et al., 2019). After juice extraction, the rind and seeds constitute approximately 54% of the fruit (Ko et al., 2021). Despite this, most pomegranate by-products are still discarded (Alexandre et al., 2019; Fourati et al., 2020), causing environmental issues. Pomegranate seeds are an excellent source of unsaturated fatty acids, including arachidic, palmitic, palmitoleic, oleic, linolenic, stearic, and linoleic acids (Eikani et al., 2012). They also contain significant amounts of polyphenols, including hydroxybenzoic acids, tannins, anthocyanins, flavonoids, and hydroxycinnamic acids (Falcinelli et al., 2017; Smaoui et al., 2019). Pomegranate seeds offer numerous health benefits, including anticancer, antiinflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects in vivo (Viuda-Martos et al., 2010a).

In the literature most of the studies focused on the fatty acid content and proximate analysis of these selected seed samples. Therefore, this study aimed to investigate the potential phenolic content and antioxidant activity of selected seeds. Pumpkin, rosehip, and pomegranate samples were purchased and separated into flesh, peel, and seeds. The seed samples were subjected to targeted analysis to determine their bioactive content.

Material and Method

Sample Preparation

Rosehip, pumpkin and pomegranate were randomly purchased as triplicates from a local market in Istanbul. The seeds were separated from the selected varieties and, all seed groups were pooled as replicates. Liquid nitrogen in a precooled IKA A11 Grinder (Staufen, Germany) was used for grinding the samples. Ground samples were then freeze dried in a freeze dryer (ALPHA 1-2 LDplus, Osterode am Harz, Germany) at -60°C with 0.001 mbar until a constant weight was reached and stored at -20°C until further analysis.

Chemicals

In the present study, all chemicals and reagents used were either analytical or HPLC grade. All chemicals and external standards (gallic acid, *p*-hydroxy benzoic acid, syringic acid, ellagic acid, ferulic acid, cyanidin-3-O-diglucoside, peonidin-3-O-glucoside, (-)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate, and kaempferol) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen Germany) for polyphenol determination.

Extraction Procedure

The extraction protocol was carried out with a weighed 0.1 g freeze-dried powder and mixed with 4 mL of 75% MeOH containing 0.1% formic acid, following the method described in a previous study (Bakır et al., 2023). The mixture was ultrasonicated for 15 min at 4°C (USC900TH, VWR ultrasonic cleaner, Radnor, PA, USA) and then centrifuged for 10 min at 4°C and $9500 \times g$ (Hettich Universal 32R, Tuttlingen, Germany). The extracts were filtered through a 0.45 µm membranes filter, and the supernatants were kept at -20°C until analysis.

Total Phenolic Content

Total phenolic content (TPC) was calculated using the Folin-Ciocalteu reagent as previously described (Singleton et al., 1999). Briefly, 100 µL of sample solution, 900 µL of distilled water, and 1.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N) were mixed and allowed to react for five minutes. Then, 1.2 mL of a 7.5% Na_2CO_3 solution was added. Following 90 minutes of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm. The results were reported as mg gallic acid equivalent (GAE)/g of sample, with a linear range of 0.001-0.6 mg/mL ($R^2 = 0.997$).

Total Flavonoid Content

Total flavonoid content (TFC) was measured following the method of Dewanto et al. (2002). In summary, 1.25 mL of distilled water was added to 250 µL of the sample in an analysis tube. Next, 75 µL of 5% NaNO_2 solution was added, and the mixture was left for 6 minutes. Then, 150 mL of a 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution was added. After 5 minutes, 0.5 mL of 1 M NaOH was added, and the total volume was adjusted to 2.5 mL with distilled water. Absorbance was measured at 510 nm against a blank. Results were reported as mg rutin equivalent/100 g of sample (linear range: 0.001-0.8 mg/mL, $R^2 = 0.991$) and mg catechin equivalent/g of sample (linear range: 0.001-0.6 mg/mL, $R^2 = 0.997$).

Determination of Total Antioxidant Capacity

The total antioxidant capacity (TAC) of seed samples was evaluated using two common methods for fruits and vegetables. The standard curve was prepared using Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and results were expressed as $\mu\text{mol trolox/g}$ sample. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) analysis was performed according to the method of Kumaran and Karunakaran (2006). In brief, 100 μL of sample was combined with 2 mL of DPPH solution (0.1 mM) and kept for 30 minutes at room temperature in the dark. Absorbance was measured at 517 nm (linear range: 0.001-0.2 mg/mL, $R^2=0.995$). The cupric reducing antioxidant capacity technique (CUPRAC) technique was also applied (Apak et al., 2004). In summary, 25 mL of Neocuproine solution (0.039 g in 96% EtOH), 250 mL of NH_4Ac buffer solution (19.27 g in distilled water), and 250 mL of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution (0.4262 g in distilled water) were used. 1 mL of each prepared solution and 1 mL of distilled water were added to an analysis tube containing 100 μL of the sample. The mixture was incubated for 30 minutes, and absorbance was measured at 450 nm ($R^2=0.997$; linear range: 0.001-0.8 mg/mL).

HPLC Analysis of Seeds Phenolic Profile

An HPLC connected to a photodiode array (HPLC-PDA) detector was used to assess the phenolic profiles of the prepared sample extracts. HPLC analysis followed the method described by Capanoglu et al. (2008). The extracts placed in 1 mL vials and analyzed on a Waters W600 HPLC system equipped with a PDA (Waters 996) detector. The stationary phase a Luna C18 reverse phase column (Phenomenex, Utrecht, The Netherlands) maintained at 40°C. The mobile phase consisted of solvent A (distilled water+0.1% (v/v) trifluoroacetic acid) and solvent B (acetonitrile+0.1% (v/v) trifluoroacetic acid). A linear gradient flow was applied as follows: 95% A and 5% B at 0 min; 65% A and 35% B at 45 min; 25% A and 75% B at 47 min; returning to the initial state at 54 min. The flow rate was a 1 mL/min. Chromatograms were recorded at 280, 312, 360, and 520 nm. Identification was based on retention times and unique UV spectra, and quantification was performed using external standard curves. Standard calibration curves, with linearity ($R^2 \geq 0.992$) in the range of 1–200 $\mu\text{g/mL}$. The LOD and LOQ were 0.2–0.4 ppm and 0.6–1.2 ppm respectively. Standards were used to express results as mg standard/100 g sample.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SPSS Statistics Program (21st version, IBM, New York, NY, USA) via one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's Range Test was applied to determine significant differences between TFC, TPC, TAC, and HPLC-PDA ($P<0.05$). All analyses were conducted in triplicate, and results were presented as mean value \pm standard deviation.

Results and Discussion

TPC and TFC of Seeds

Variations in TPC and TFC of seed samples are demonstrated in Figure 1. Statistical analysis showed significant differences among samples for both assays

($P<0.05$). Pomegranate seeds had the highest TPC at 45.6 ± 3.1 mg GAE/g sample. In contrast, rosehip and pumpkin seeds have much lower amounts (4.5 ± 0.32 mg GAE/g sample and 1.23 ± 0.06 mg GAE/g sample, respectively). Elmastas et al. (2017) pointed out rutin and catechin as the two most prevalent phenolic compounds in Rosa species, while Park et al. (2010) identified equol, kaempferol, quercetin, and catechin as major flavonoids in pomegranate, with catechin specifically found in seeds. On the other hand, different levels of rutin and catechin were found in pumpkin seeds (Ahmed et al., 2024). Given this situation, TFC values of samples were calculated using both catechin and rutin equivalents, considering the diversity in dominant flavonoids among seed samples.

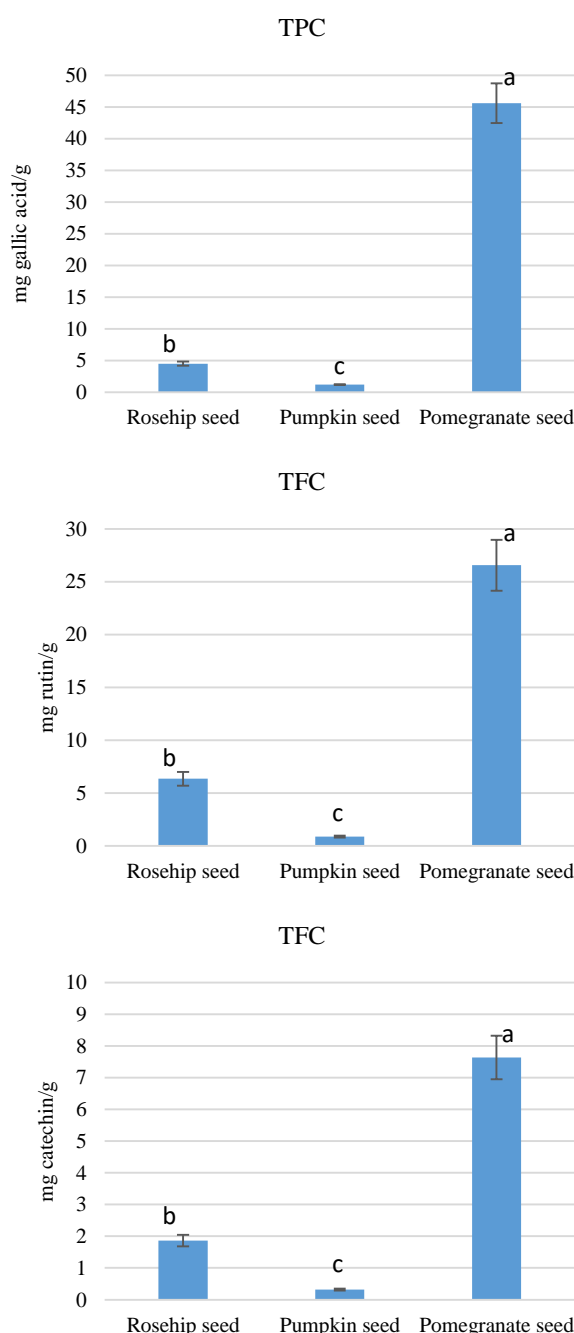


Figure 1. TPC and TFC analysis of samples

Table 1. TAC values of seed samples.

Samples	CUPRAC	DPPH
Rosehip seed	5.98±0.53 ^b	21.54±0.31 ^b
Pumpkin seed	2.99±0.27 ^b	2.60±0.15 ^b
Pomegranate seed	458.36±10.37 ^a	284.62±15.26 ^a

*Results were expressed as $\mu\text{mol trolox/g}$ sample. Different letters refer the statistical differences between samples in same column ($P < 0.05$).

The highest TFC was observed in pomegranate seeds (7.6 ± 0.7 mg catechin/g sample and 26.6 ± 2.4 mg rutin/g sample), followed by rosehip seeds (1.9 ± 0.2 mg catechin/g sample and 6.4 ± 0.7 mg rutin/g sample) ($P < 0.05$). Despite differences in catechin (0.32 ± 0.03 mg /g sample) and rutin (0.89 ± 0.1 mg/g sample) content, TFC values in both equivalents were not statistically significant in pumpkin seeds. ($P > 0.05$). The low metabolite content of samples could cause these results.

For rosehip, TPC ranged from 31.08 ± 0.19 to 52.94 ± 0.47 mg GAE/g in Gümüşhane, Türkiye (Demir et al., 2014), while varieties from Erzurum, Türkiye, showed values between 10.74 ± 3.09 to 14.35 ± 2.62 mg GAE/g (Macit et al., 2023). In contrast, a study on rosehip seeds from Gumushane, Türkiye found 2.55 mg GAE/g (Ilyasoğlu, 2014), and in Pakruojis District, Lithuania, rosehip seeds had a range from 130.04 to 207.31 mg GAE/100 g for five different species (Medveckienė et al., 2020). Similarly, regarding pumpkin seeds, Nigerian seeds dried at 40°C had a TPC of 32.90 mg GAE/g (Akomolafe et al., 2016). Another study on South-Western Nigeria pumpkin seeds showed raw samples at 4.28 mg GAE/g increased to 13.35 mg GAE/g after roasting at 100°C for 30 min (Akomolafe, 2021). Sargodha, Pakistan pumpkin seeds, had a TPC of 224.61 ± 1.60 mg GAE/100 g powder (Hussain et al., 2021). The drying method could explain the relatively lower TPC content of pumpkin seed comparing to literature. Moreover that, TPC for pomegranate seeds in California (3.39 mg GAE/g sample) was almost three times that found in pomegranate juice (1.03 mg GAE/g sample) (Ambigaipalan et al., 2017). Pomegranate seeds from Natanz, Shahreza, and Doorak in Iran had TPC values between 72.4 ± 10.02 mg and 73 ± 13.35 mg GAE/g sample (Derakhshan et al., 2018). These findings showed that there is a wide range variation at TPC and TFC content of seed samples. This variation could be attributed to differences in plant origin and growing conditions.

TFC values for rosehip genotypes collected from different parts of mountain Rtanj (Serbia) were reported as 196.26 mg rutin/g sample (Tumbas et al., 2012), while *Rosa moschata* from the Kullu Valley in Northwestern India, showed TFC values of 498 ± 0.50 mg rutin/g in water and 557.33 ± 0.57 mg rutin/g in methanol (Shashni & Sharma, 2022). In *Rosa canina* and *Rosa pimpinellifolia*, TPC was recorded at 22.42 ± 1.26 mg catechin/g and 26.43 ± 5.76 mg catechin/g, respectively (Macit et al., 2023). These differences could stem from varying plant material, growing condition and solvents used in extraction. The TFC of Sargodha, Pakistani pumpkin seeds (sun- and hot air-dried) was higher than that of the peel and flesh, at 139.37 ± 1.07 mg catechin/100 g powder (Hussain et al., 2021). Roasting of China's Beitun pumpkin seeds increased TPC and TFC, with the highest values at 200°C being roughly 1.56 and 2.81 times higher than that of unroasted seeds (Peng et al., 2021). This increase might

result from cell structure breakdown and potential Maillard reaction products that react with Folin-Ciocalteu reagent, explaining higher literature values (Peng et al., 2021). Similarly, in a study, the TFC content of pomegranate seed samples from the Alentejo region of Portugal (Campos et al., 2022) varied between 7-21 mg catechin/g sample. TFC of some pomegranate seed samples from Natanz, Shahreza, and Doorak provinces in Iran ranged from 7.55 ± 2.12 mg rutin/g sample to 38 ± 6.38 mg rutin/g sample (Derakhshan et al., 2018.). In Moroccan pomegranates, TFC in the peel and seeds varied from 52.13 to 62.64 mg rutin/g and from 1.76 to 2.11 mg rutin/g, respectively (Sabraoui et al., 2020). Notably the TFC content of peel extracts from Beni Mellal, Berkane, and Settat was found to be 36, 24, and 25 times higher, respectively, than the TFC content in seeds. On the other hand, red grape seeds had the highest TFC value (330.60 mg catechin/g), which is approximately 2.5 times higher than that of white grape seeds (133.08 mg catechin/g) and 300 times higher than of pulp (averaging 1.08 mg catechin/g), according to a study on grape seeds and pulp (Wongnarat & Srihanam, 2017). The TPC and TFC contents reported in this study differ from those in other studies in the literature. Variations may be due to differences in plant material, sample preparation, and extraction conditions used in analysis. Additionally, some studies found higher TPC or TFC content in peels, while others found higher in seeds.

TAC of Seeds

TAC levels of samples were measured using two different assays and are presented in Table 1. According to the results, the antioxidant activity of pumpkin and rosehip seeds was quite similar ($P > 0.05$), whereas both differed significantly from that of pomegranate seeds ($P < 0.05$). Pomegranate seeds contained a higher amount of antioxidative compounds. Additionally, this study provides an opportunity to compare the CUPRAC and DPPH assays. Generally, the CUPRAC assay yields elevated results compared to the DPPH assay. Here, pomegranate seeds demonstrated a higher trolox equivalent with CUPRAC assay ($P < 0.05$), while rosehip seed exhibited a lower equivalent ($P < 0.05$). Despite the different working mechanisms of the TAC assays, TAC levels of pumpkin seeds did not differ significantly between the two assays ($P > 0.05$).

It is crucial to evaluate the antioxidant activity of plant tissues in relation to their biological activity, as compounds possessing antioxidant potential can protect the human body from the harmful effects of free radicals, slow down aging, and help prevent formation of tumors (Cai et al., 2004). As a result, a large number of studies on the antioxidant activity of various plants have been published in the scientific literature. Due to the complex mechanisms underlying antioxidant activity, which depend on a variety of factors, including temperature, solvent, phenolics'

chemical structure, and the medium's pH, it is not feasible to determine the antioxidant activity of a product using a single method (Viuda-Martos et al., 2010). The purple DPPH radical is reduced to 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine in the DPPH assay, which works with hydrophobic systems. The reducing power of antioxidants can be measured by CUPRAC assay, which has the advantages of neutral pH of 7.0, which is close to biological systems, greater reagent stability than radical reagents, and compatibility with both hydrophilic and lipophilic solvents (Apak et al., 2004).

In one study, rosehip seed methanolic extract demonstrated 108 μmol trolox/g sample antioxidant activity with CUPRAC assay (Ozyurt et al., 2016), while Ilyasoglu (2014) reported 10.4 μmol trolox/g rosehip seed at fresh weight basis using ABTS analysis. For pumpkin seeds antioxidant activity ranged from 0.443 to 1.220 μmol trolox/g on a fresh weight basis using DPPH assay (Nawirska-Olszańska et al., 2013). In pomegranate seeds, 55.5 μmol trolox/g antioxidant activity was recorded for samples from Sanlurfa, Türkiye in a study where samples were subjected to open air drying at room temperature for 5 days (Alsataf et al., 2021), whereas 0.36 μmol of trolox/g sample was found in samples from California, USA by using the DPPH radical scavenging assay in a study where samples firstly subjected to defatting with hexane and then drying under room temperature (Ambigaipalan et al., 2017). Antioxidant activity in fruits and vegetables is influenced by several variables, including cultivar, plant parts, climate, and fruit ripeness stage, as well as the pre-treatments of samples. Thus, the observed variation between seeds in this study and in the literature is reasonable.

Phenolic Profile of Seed Samples

Individual phenolic compounds are presented in Table 2, highlighting the diversity of phenolic compounds in seeds. Rosehip seeds contain high amounts of flavanols,

including catechin, epicatechin, and epigallocatechin gallate. Additionally, a flavanol, kaempferol, was also detected (5.9 ± 0.02 mg/100 g sample), along with gallic acid (8.7 ± 0.08 mg/100 g sample). In a study, catechin and 21 other phenolic compounds were identified using LC-MS/MS in rosehip seed powder (Gavarić et al., 2023), demonstrating consistency with the present findings.

Pumpkin seeds contain primarily hydroxybenzoic acid derivatives, with syringic acid as the dominant compound (22.4 ± 2.59 mg/100 g sample), followed by p-hydroxybenzoic acid and gallic acid. The primary chemical composition and oil properties of seeds from a Tunisian pumpkin (*Cucurbita maxima*) variety called Béjaoui were examined (Rezig et al., 2012). Protocatechuic, syringic, caffeic, p-coumaric, vanillic, and ferulic acids were the six phenolic acids found; syringic acid was the most prevalent phenolic acid at 7.96 mg/100 g. The seed oil of the Béjaoui variety (a Tunisian variety) did not contain gallic or p-hydroxybenzoic acids, with concentrations recorded at 0.20 and 0.26 mg/100 g, respectively (Rezig et al., 2012). Although p-hydroxybenzoic acid is the most prevalent phenolic acid found in pumpkins, other phenolics like caffeic, p-coumaric, ferulic, sinapic, protocatechuic, vanillic, syringic acid, and p-hydroxybenzaldehyde have also been detected (Krimer-Malešević, 2020). HPLC analysis of raw pumpkin seed extract also identified nicotine, rutin, quinine, caffeic acid, and chlorogenic acid (Akomolafe, 2021). Ellagic acid is the most abundant phenolic compound in pomegranate seeds (165 ± 1.45 mg/100 g sample), along with substantial amounts of punicalagin derivatives. Pomegranate is one of the richest fruits in phenolic compounds, containing punicalagin, anthocyanins, punicalin and gallic and ellagic acids. Seed extracts from Moroccan pomegranates showed ellagic acid concentrations ranging from 1.1-1.6 mg /g sample (Sabraoui et al., 2020).

Table 2. HPLC-PDA detected compounds in seeds

Compound	Pumpkin seed	Rosehip seed	Pomegranate seed
Hydroxybenzoic acids			
Gallic acid	8.8±0.21	8.7±0.08	7.3±0.04
p-hydroxy benzoic acid	11.0±1.01	N.D.	N.D.
Syringic acid	22.4±2.59	N.D.	N.D.
Ellagic acid	N.D.	N.D.	165±1.45
Hydroxycinnamic acids			
Ferulic acid	1.0±0.01	N.D.	N.D.
Hydrolyzable tannins			
Punicalagin derivative 1	N.D.	N.D.	45.9±1.29
Punicalagin derivative 2	N.D.	N.D.	191.3±1.15
Anthocyanins			
Cyanidin-3-O-diglucoside	N.D.	N.D.	10.9±0.55
Peonidin-3-O-glucoside	N.D.	N.D.	11±0.27
Flavanols			
(-)-Catechin	N.D.	5.2±0.24	N.D.
(-)-Epicatechin	N.D.	5±0.33	N.D.
(-)-Epigallocatechin gallate	N.D.	3.7±0.21	N.D.
Flavonols			
Kaempferol	N.D.	5.9±0.02	N.D.

*Results were expressed as mg standard/100 g sample. Punicalagin derivatives were calculated as ellagic acid equivalent. N.D.: Not detected.

The antioxidant property of the pomegranate extracts is illustrated to the presence of phenolic acid derivatives, flavonoids, punicalin, and hydrolyzable tannins, including punicalagins, anthocyanins, and ellagic acid derivatives (Kalaycıoğlu & Erim, 2017), while the most common phenolics, protocatechuic acid, caffeic acid, quercetin, p-coumaric acid, gallic acid, and ferulic acid are responsible the antioxidant activity in pumpkins (Babbar et al., 2015), and rosehip fruits are generally rich in bioactive compounds with antioxidant activity, particularly in flavonoids, carotenoids, tannins, phenolic acids, mineral compounds, and fatty and organic acids (Ayati et al., 2019). The total amount of quantified compounds was correlated with the TAC assays and results indicated that both applied TAC assay exhibited high correlation with them ($R^2 > 0.99$). General overview indicated consistency with the literature data. However, the number of identified compounds varies with the geographical origin, growing condition of plant, and harvesting season. Moreover, pre-treatment application, storage condition, differences at extraction protocols could change the qualified phenolic compounds from seeds.

Discarding of food wastes is a problem that can be solved easily by utilizing these food wastes as alternative sources. Since pumpkin fruit has excellent phytochemistry and can have positive health effects, the food and pharmaceutical industries can use all these pumpkin parts as therapeutic agents by isolating and characterizing the bioactives in the form of powders or extracts instead of throwing them away during processing (Hussain et al., 2022). Using the trolox equivalent antioxidant capacity assay, it was also discovered by Ilyasoglu (2014), that the seed oil and rosehip seeds exhibited high antioxidant activity. Pomegranates contain a lot of aril, which makes up between 50 and 70 % of the fruit overall and is composed of 78% juice and 22% seeds (Mohagheghi et al., 2011). Pomegranate seeds, which are produced in large quantities each year as a by-product of the juice and concentrate industries, could be used more profitably in the food industry rather than as animal feed or in manufactured cosmetics (Kalamara et al., 2015).

Conclusion

In scope of the present study, pomegranate, rosehip and pumpkin seeds were investigated for their bioactive components. The TPC, TFC and TAC of the samples were compared. Variations in individual phenolic compounds suggest these seeds have the potential to be valuable sources of naturally occurring bioactive compounds. These bioactive compounds can be utilized as functional ingredients that can replace artificial food additives such as nutraceuticals and preservatives in the food, pharmaceutical and other industries. Utilizing seeds obtained from food waste will be advantageous in minimizing discarded food parts and enhancing sustainability for a better world. The different phenolic substances of the seed included in this study may allow them to serve different purposes. Further studies should be carried out in this direction, specially design of new studies to assess proposed materials as food additives is recommended.

Declarations

Conflicts of Interest

There is no conflict of interest disclosed by the author.

References

- Ahmed, I. A. M., Özcan, M. M., Uslu, N., Mohammed, B. M., & Albakry, Z. (2024). The effect of sprouting and roasting on bioactive compounds, phenolic and fatty acid profiles and some element contents of pumpkin seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(1), 464–473. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02195-x>
- Akomolafe, S. F. (2021). Effects of roasting on the phenolic phytochemicals and antioxidant activities of pumpkin seed. *Vegetos*, 34(3), 505–514. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00226-w>
- Akomolafe, S. F., Oboh, G., Oyeleye, S., Molehin, O., & Ogunsuyi, O. (2016). Phenolic Composition and Inhibitory Ability of Methanolic Extract from Pumpkin (*Cucurbita pepo* L) Seeds on Fe-induced Thiobarbituric acid reactive species in Albino Rat's Testicular Tissue In-Vitro. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 115–120. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60917>
- Alexandre, E. M. C., Silva, S., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International*, 115, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>
- Alsataf, S., Başıyigit, B., & Karaaslan, M. (2021). Multivariate Analyses of the Antioxidant, Antidiabetic, Antimicrobial Activity of Pomegranate Tissues with Respect to Pomegranate Juice. *Waste and Biomass Valorization*, 12(11), 5909–5921. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01427-9>
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSn. *Food Chemistry*, 221, 1883–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.058>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Ayati, Z., Amiri, M. S., Ramezani, M., Delshad, E., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2019). Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(35), 4101–4124. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181010151849>
- Babbar, N., Oberoi, H. S., & Sandhu, S. K. (2015). Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 319–337. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653734>
- Bakır, S., Hall, R. D., de Vos, R. C. H., Mumm, R., Kadakal, Ç., & Capanoglu, E. (2023). Effect of drying treatments on the global metabolome and health-related compounds in tomatoes. *Food Chemistry*, 403, 134123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134123>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Campos, L., Seixas, L., Henriques, M. H. F., Peres, A. M., & Veloso, A. C. A. (2022). Pomegranate Peels and Seeds as a Source of Phenolic Compounds: Effect of Cultivar, By-Product, and Extraction Solvent. *International Journal of Food Science*, 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/9189575>

- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., & de Vos, R. (2008). Changes in Antioxidant and Metabolite Profiles during Production of Tomato Paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 964–973. <https://doi.org/10.1021/jf072990e>
- Chrubasik, C., Roufogalis, B., Müller-Ladner, U., & Chrubasik, S. (2007). Systematic review on the Rosa canina effect and efficacy profiles. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 12(s1), 14–14. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7166.2007.tb05861.x>
- Demir, N., Yildiz, O., Alpaslan, M., & Hayaloglu, A. A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (Rosa L.) fruits in Türkiye. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038>
- Deng, G.-F., Shen, C., Xu, X.-R., Kuang, R.-D., Guo, Y.-J., Zeng, L.-S., Gao, L.-L., Lin, X., Xie, J.-F., Xia, E.-Q., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W.-H., & Li, H.-B. (2012). Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8308–8323. <https://doi.org/10.3390/ijms13078308>
- Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., Conti, G. O., & Sadrabad, E. K. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.023>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Eikani, M. H., Golmohammad, F., & Homami, S. S. (2012). Extraction of pomegranate (Punica granatum L.) seed oil using superheated hexane. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.002>
- Elmastaş, M., Demir, A., Genç, N., Dölek, Ü., & Güneş, M. (2017). Changes in flavonoid and phenolic acid contents in some Rosa species during ripening. *Food Chemistry*, 235, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.004>
- Falcinelli, B., Marconi, O., Maranghi, S., Lutts, S., Rosati, A., Famiani, F., & Benincasa, P. (2017). Effect of Genotype on the Sprouting of Pomegranate (Punica granatum L.) Seeds as a Source of Phenolic Compounds from Juice Industry by-Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(4), 432–438. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0645-y>
- FAO. (2024). *Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fourati, M., Smaoui, S., Hlima, H. Ben, Elhadef, K., Braïek, O. Ben, Ennouri, K., Mtibaa, A. C., & Mellouli, L. (2020). Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Pomegranate (Punica granatum) Seeds - A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00863-7>
- Gavarić, A., Pastor, K., Nastić, N., Vidović, S., Živanović, N., Simin, N., Duarte, A. R. C., & Vladić, J. (2023). Recovery of Polyphenols from Rosehip Seed Waste Using Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasonic Waves Simultaneously. *Foods*, 12(19), 3655. <https://doi.org/10.3390/foods12193655>
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of *Rosa micrantha*: An Alternative Antioxidants Source for Food, Pharmaceutical, or Cosmetic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6277–6284. <https://doi.org/10.1021/jf101394w>
- Hussain, A., Kausar, T., Din, A., Murtaza, M. A., Jamil, M. A., Noreen, S., Rehman, H. ur, Shabbir, H., & Ramzan, M. A. (2021). Determination of total phenolic, flavonoid, carotenoid, and mineral contents in peel, flesh, and seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15542>
- Hussain, A., Kausar, T., Sehar, S., Sarwar, A., Ashraf, A. H., Jamil, M. A., Noreen, S., Rafique, A., Iftikhar, K., Qudoods, M. Y., Aslam, J., & Majeed, M. A. (2022). A Comprehensive review of functional ingredients, especially bioactive compounds present in pumpkin peel, flesh and seeds, and their health benefits. *Food Chemistry Advances*, 1, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100067>
- Ilyasoğlu, H. (2014). Characterization of Rosehip (*Rosa canina* L.) Seed and Seed Oil. *International Journal of Food Properties*, 17(7), 1591–1598. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.777075>
- Kalamara, E., Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2015). An integrated process for utilization of pomegranate wastes — Seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.001>
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2017). Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry*, 221, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.084>
- Karaś, M., Szymanowska, U., Borecka, M., Jakubczyk, A., & Kowalczyk, D. (2024). Antioxidant Properties of Wafers with Added Pumpkin Seed Flour Subjected to In Vitro Digestion. *Applied Sciences*, 14(12), 5129. <https://doi.org/10.3390/app14125129>
- Ko, K., Dadmohammadi, Y., & Abbaspourrad, A. (2021). Nutritional and Bioactive Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A Review. *Foods*, 10(3), 657. <https://doi.org/10.3390/foods10030657>
- Krimer-Malešević, V. (2020). Pumpkin Seeds. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 533–542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818553-7.00037-1>
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. *Food Chemistry*, 97(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.032>
- Lemus-Mondaca, R., Marin, J., Rivas, J., Sanhuesa, L., Soto, Y., Vera, N., & Puente-Díaz, L. (2019). Pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*). A review of functional attributes and by-products. *Revista Chilena de Nutrición*, 46(6), 783–791. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000600783>
- Macit, M., Aras, A., Capanoglu Güven, E., & Bakir, S. (2023). Investigating the Content and Bioaccessibility of Phenolic Compounds In Roots of *Rosa canina* L. and *Rosa pimpinellifolia* L. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 33(2), 163–173. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.1231881>
- Medveckienė, B., Kulaitienė, J., Jarienė, E., Vaitkevičienė, N., & Hallman, E. (2020). Carotenoids, Polyphenols, and Ascorbic Acid in Organic Rosehips (*Rosa* spp.) Cultivated in Lithuania. *Applied Sciences*, 10(15), 5337. <https://doi.org/10.3390/app10155337>
- Mohagheghi, M., Rezaei, K., Labbafi, M., & Ebrahimzadeh Mousavi, S. M. (2011). Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 730–736. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000334>
- Nawirska-Olszańska, A., Kita, A., Biesiada, A., Sokół-Łętowska, A., & Kucharska, A. Z. (2013). Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chemistry*, 139(1–4), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.009>
- Nieto, G., Martínez-Zamora, L., Peñalver, R., Marín-Iniesta, F., Taboada-Rodríguez, A., López-Gómez, A., & Martínez-Hernández, G. B. (2023). Applications of Plant Bioactive Compounds as Replacers of Synthetic Additives in the Food Industry. *Foods*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.3390/foods13010047>
- Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R., Hamilton, J. F., Lewis, A. C., & Ozel, M. Z. (2016). GC× GC-TOF/MS Chromatographic Analysis, Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Rosa Canina* L. at Different Maturities. *Records of Natural Products*, 10(4).

- Park, H. M., Moon, E., Kim, A., Kim, M. H., Lee, S., Lee, J. B., Park, Y. K., Jung, H., Kim, Y., & Kim, S. Y. (2010). Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. *International Journal of Dermatology*, 49(3), 276–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04269.x>
- Passafiume, R., Perrone, A., Sortino, G., Gianguzzi, G., Saletta, F., Gentile, C., & Farina, V. (2019). Chemical–physical characteristics, polyphenolic content and total antioxidant activity of three Italian-grown pomegranate cultivars. *NFS Journal*, 16, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.06.001>
- Peng, M., Lu, D., Liu, J., Jiang, B., & Chen, J. (2021). Effect of Roasting on the Antioxidant Activity, Phenolic Composition, and Nutritional Quality of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seeds. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.647354>
- Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., & Hamdi, S. (2012). Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.004>
- Sabraoui, T., Khider, T., Nasser, B., Eddoha, R., Moujahid, A., Benbachir, M., & Essamadi, A. (2020). Determination of Punicalagins Content, Metal Chelating, and Antioxidant Properties of Edible Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels and Seeds Grown in Morocco. *International Journal of Food Science*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/8885889>
- Shashni, S., & Sharma, S. (2022). Antioxidant activities of dried wild rosehips (*Rosa moschata*) of Kullu Valley, Northwestern Indian Himalaya. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. <https://doi.org/10.56042/ijnpr.v13i3.52195>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent (pp. 152–178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smaoui, S., Hlima, H. Ben, Mtibaa, A. C., Fourati, M., Sellem, I., Elhadeif, K., Ennouri, K., & Mellouli, L. (2019). Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. *Meat Science*, 158, 107914. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107914>
- Tarım ve Orman Bakanlığı. (2022a). *Kuşburnu Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi*. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/YATI-RIMCI%20REHBER%C4%B0/KUSBURNU%20F%C4%B0Z%C4%B0B%C4%B0L%C4%B0TE%20RAPORU.Pdf>
- Tarım ve Orman Bakanlığı. (2022b). *Nar Yetiştiriciliği*. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/Alata/Belgeler/Brosurler/Brosur2022/NarYeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi-NesrinKARATA%C5%9E.Pdf>
- Tumbaş, V. T., Čanadanović-Brunet, J. M., Gille, L., Dilas, S. M., & Četković, G. S. (2012). Characterization of the free Radical Scavenging Activity of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Extract. *International Journal of Food Properties*, 15(1), 188–201. <https://doi.org/10.1080/10942911003754742>
- Tylewicz, U., Nowacka, M., Martín-García, B., Wiktor, A., & Gómez Caravaca, A. M. (2018). Target sources of polyphenols in different food products and their processing by-products. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 135–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00005-1>
- Ünlü, A., Arslan, Z. F., ARSLAN, R., & CEYLAN, F. (2023). Ülkesel ve Bölgesel Ölçekte Türkiye'nin Bitkisel Atık Miktarları. *Düzce Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(1), 26–37.
- Vilas-Boas, A. A., Pintado, M., & Oliveira, A. L. S. (2021). Natural Bioactive Compounds from Food Waste: Toxicity and Safety Concerns. *Foods*, 10(7), 1564. <https://doi.org/10.3390/foods10071564>
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635–654. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>
- Vodnar, D. C., Călinoiu, L. F., Dulf, F. V., Ștefănescu, B. E., Crișan, G., & Socaciu, C. (2017). Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food Chemistry*, 231, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.131>
- Wongnarat, C., & Srihanam, P. (2017). Phytochemical and Antioxidant Activity in Seeds and Pulp of Grape Cultivated in Thailand. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(1), 113–121. <https://doi.org/10.13005/ojc/330112>



The Functional Aspects of Spices Used in Turkish Cuisine

Özlem Özer Altundağ^{1,a,*}, Ufuk Samav^{2,b}

¹Karabük University, Faculty of Safranbolu Tourism, Department of Gastronomy and Culinary Arts, 78600, Karabük, Türkiye

²Sinop University, Gerze Vocational School, Department of Cooking, 57600, Sinop, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 25.09.2024 Accepted : 12.11.2024</p> <p>Keywords: Turkish Cuisine Spices Functional Components Terpenoids Health</p>	<p>Turkish cuisine, throughout its history, has a wide range of spices due to the influence of various cultures and the rich lands of Anatolia. In this study, spices commonly used in Turkish cuisine were examined for terpenoids and phenolic compounds, which are functional components. Terpenoids are known for their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer properties, while phenolic compounds exhibit strong antioxidant and pro-oxidant properties. By conducting a literature review, the active ingredient contents, antioxidant capacities, and ORAC values of 24 spices were determined. The evaluation of the research showed that the spices containing the most terpenoids and phenolic compounds were anise (11 types), poppy seed (10 types), black pepper (10 types), cinnamon (10 types), thyme (9 types), coriander (8 types), and sumac (8 types). The most common functional components found in the spices were carotene (alpha, beta, and gamma) (in 17 spices), tocopherol (alpha, beta, and gamma) (in 15 spices), phyloquinone (in 11 spices), lutein (in 9 spices), and betaine (in 8 spices). Studies support that these spices, which are indispensable elements of Turkish cuisine, have beneficial effects on human health, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer effects due to the various terpenoid and phenolic compounds they contain. This study highlights that Turkish cuisine, with its rich spice content, supports health maintenance and improvement. Considering the recent increase in functional nutrition practices for health, Turkish cuisine is well-suited to support functional nutrition. Given the potential health benefits of the spices used in Turkish cuisine, incorporating them into daily dietary habits is recommended for the sustainability of health.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2355-2367, 2024

Türk Mutfağında Kullanılan Baharatların Fonksiyonel Yönü

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 25.09.2024 Kabul : 12.11.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Türk Mutfağı Baharatlar Fonksiyonel Bileşenler Terpenoidler Sağlık</p>	<p>Türk mutfağı, tarihi boyunca çeşitli kültürlerin etkisi ve Anadolu'nun zengin toprakları sayesinde geniş bir baharat yelpazesine sahiptir. Bu çalışmada, Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan baharatlar fonksiyonel bileşenler olan terpenoidler ve fenolik bileşikler açısından incelenmiştir. Terpenoidler antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri ile bilinirken; fenolik bileşikler güçlü antioksidan ve pro-oksidatif özellikler göstermektedir. Çalışmada, literatür araştırması yapılarak Türk mutfağında kullanılan 24 adet baharatın etken madde içerikleri, antioksidan kapasiteleri ve ORAC değerleri beslenme veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir. Araştırmalar ve veri tabanlarından elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde anason (11 çeşit), haşhaş (10 çeşit), karabiber (10 çeşit), tarçın (10 çeşit), kekik (9 çeşit), kişniş (8 çeşit) ve sumak (8 çeşit) olmak üzere bu baharatların en fazla terpenoid ve fenolik bileşen içeren baharatlar olduğu görülmüştür. Baharatlarda en yaygın görülen fonksiyonel bileşenler ise sırasıyla karoten (alfa, beta ve gama) (17 tanesinde), tokoferol (alfa, beta ve gama) (15 tanesinde), filokinon (11 tanesinde), lutein (9 tanesinde) ve betain (8 tanesinde) olarak bulunmuştur. Türk mutfağının vazgeçilmez unsurlarından birisi olan bu baharatların, içerdikleri çeşitli terpenoid ve fenolik bileşikler ile insan sağlığı üzerinde antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser gibi olumlu etkilere sahip olduğu çalışmalarla desteklenmektedir. Bu çalışma Türk mutfağının kullanılan baharatlar ile sağlığı korumayı ve iyileştirmeyi destekleyici özellikte olduğunu ortaya koymaktadır. Son yıllarda sağlık için artan fonksiyonel beslenme uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda Türk mutfağı içerik bakımından fonksiyonel beslenmeyi destekleyici niteliktedir. Türk mutfağında kullanılan baharatların sağlık üzerindeki bu potansiyel faydaları göz önüne alındığında, bu baharatların günlük beslenme alışkanlıklarına dahil edilmesi sağlığın sürdürülebilirliği açısından önerilebilir.</p>

^a ozlemezaltundag@karabuk.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0001-7117-6335>

^b ufuksamav@sinop.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-2055-6378>



Giriş

Günümüzde sağlıklı beslenme ve yaşam tarzı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. İnsanlar doyurucu ve besleyici olmanın ötesinde gıdaların sağlık üzerindeki olumlu etkilerini araştırmaktadır. Bu bağlamda, Türk mutfağı, zengin ve çeşitli lezzetleriyle uluslararası mutfaklar arasında özel bir yer edinmiştir. Tarih boyunca farklı kültürlerin etkileşimi ve Anadolu'nun verimli topraklarının sunduğu çeşitlilikle beslenmiştir (Güney, 2023). Türk mutfağının vazgeçilmez unsurlarından biri olan baharatlar, yemeklere sadece tat ve aroma katmakla kalmaz, aynı zamanda sağlığa faydalı birçok biyoaktif bileşen içerir. Bu bileşenler arasında terpenoidler ve fenolik bileşikler, dikkat çekici özellikleriyle öne çıkmaktadır.

Terpenoidler, bitkisel kaynaklı bileşikler olup, çeşitli farmakolojik etkiler sergilemektedirler. Antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri, terpenoidlerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini açıklamaktadır. Örneğin, kekik ve biberiye gibi baharatlar, yüksek terpenoid içeriği ile bilinir ve bu nedenle bağışıklık sistemini güçlendirmede, iltihaplanmayı azaltmada ve mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadelede etkili olabilirler. Terpenoidlerin bu fonksiyonel özellikleri, Türk mutfağında baharatların yaygın kullanımlarını destekler niteliktedir (Tang ve ark., 2018).

Fenolik bileşikler ise, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve güçlü antioksidan ve pro-oksidatif özelliklere sahip olan bileşenlerdir (Tatipamula ve Kukavica, 2021). Bu bileşikler, serbest radikalleri nötralize ederek hücresel hasarı önler ve kronik hastalıkların gelişme riskini azaltır. Fenolik bileşikler, aynı zamanda anti-inflamatuar ve antikanser özellikler de gösterirler (Akanbong vd, 2021). Zerdeçal, karanfil ve tarçın gibi baharatlar, yüksek fenolik içerikleriyle öne çıkar ve bu bileşenlerin sağlığa olan katkıları nedeniyle geleneksel ve modern tıpta geniş bir kullanım alanı bulurlar (Manandhar, 2018).

Bu çalışmada, Türk mutfağında sıkça kullanılan baharatların terpenoidler ve fenolik bileşikler açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Araştırmanın temel hedefi, bu baharatların fonksiyonel besin bileşenlerini ortaya çıkararak Türk mutfağında kullanılan baharatların sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koymaktır. Böylece, geleneksel Türk mutfağının zengin baharat çeşitliliğinin, sadece gastronomik değerinin ötesinde, sağlık açısından da ne denli önemli olduğu bilimsel bir perspektifle ele alınacaktır.

Literatür Taraması

Terpenoidler, Fenolik Bileşenler ve Baharatlar

Fonksiyonel besinler, belirlenmiş beslenme rollerinin ötesinde, bir veya daha fazla fizyolojik işlevi hedefli bir şekilde faydalı bir şekilde etkileyerek genel sağlık durumunu iyileştiren ve farklı hastalık riskini azaltan besinlerdir (Bielecka-Dabrowa ve ark., 2023; Ziaei ve ark., 2024). Fonksiyonel besinler, oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon gibi yaşlanma sürecinde ve zayıflıkta yer alan mekanizmaları etkileme potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda, başlangıçtan gelişime kadar olan süreçte hastalık kontrolünün çeşitli aşamalarında sağlığı teşvik edici rollere sahiptir. Böylece hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde etkili bir şekilde uygulanabilirler (Hammoudi Halat ve ark., 2023; Ziaei ve

ark., 2024). Dolayısıyla, günümüzde bulaşıcı olmayan hastalıkların önlenmesinde besinlerin önemi artmaktadır (Pravst, 2012). Fonksiyonel bileşenler arasında, bazı bulaşıcı olmayan hastalıkların ortaya çıkmasını önlemek için vücutta işlev gören bitki kaynaklı ve biyolojik olarak aktif kimyasallar olan fitokimyasallar yer almaktadır (Vignesh ve ark., 2024). Fonksiyonel bileşenler çoklu formlarda ortaya çıkmaktadır.

Terpenoidler, İzopren birimleri olarak adlandırılan beş karbonlu izopentan birimlerinin moleküllerinden türetilmiştir. Yaklaşık 30.000 ikincil metabolitten oluşan gruba verilen isimdir. (Bathe ve Tissier, 2019). Terpenler, bitki ve baharatların bazı farmakolojik özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Antimikrobiyal, antikanser, anti-inflamatuar ve anti-diyabetik gibi birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir. (Tang ve ark., 2018).

Karotenoidler; En yaygın doğal pigmentler arasında yer alan karotenoidler, bitki yaprakları, meyveler ve çiçeklerin kırmızı, turuncu ve sarı tonlarının yanı sıra bazı kuşların böceklerin, balıkların ve kabukluların renklerinin çoğundan sorumludur (Zia-Ul-Haq, 2021). Karotenoidlerin benzersiz yapısı, potansiyel biyolojik işlevlerini ve eylemlerini belirler. Çoğu karotenoid, konjuge çift bağ sistemi içeren 40 karbonlu bir bazal yapıdan türetilmektedir. Bileşimlerine göre karotenoidler, sadece karbon ve hidrojen atomları içeren hidrokarbonlar (karoten, likopen) ve en az bir oksijen atomu taşıyan oksokarotenoidler (lutein, kapsantin) olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Beltrán ve Wurtzel, 2024).

Tokoferoller ve Tokotrienoller; Tokoferoller ve tokotrienoller, doymuş (tokoferoller) veya doymamış (tokotrienoller) izoprenoid yan zincire bağlı fenolik-kromanol halkası içeren lipitte çözünen fonksiyonel bileşenlerdir. Ayrıca, Fenolik-kromanol halkası üzerindeki metil gruplarının sayısı ve konumu bakımından farklılık gösteren alfa, beta, gama ve delta olmak üzere dört birincil tokoferol ve tokotrienol formu vardır. Buna ek olarak, tokoferoller izoprenoid yan zincirinin iki, dört ve sekizinci pozisyonlarında üç asimetrik karbona sahiptir. Yaygın olarak bitkisel ve hayvansal yapılarda bulunmaktadır (Lobo ve ark., 2010; Srividya ve ark., 2010).

Saponinler; "Saponin" terimi, Latince'de sabun anlamına gelen "sapo" kelimesinden türetilmiştir (Küçük Kurt ve Fidan, 2008). Saponinler, hem çeşitli bitkilerde hem de belirli deniz organizmalarında doğal olarak bulunan glikozitlerdir. Bu bileşikler, yapısal olarak bir şeker molekülüne bağlı triterpenoid veya steroid aglikon içerirler. Saponinler, bitkilerde savunma mekanizmaları olarak işlev görebilirken, deniz organizmalarında çeşitli biyolojik roller üstlenebilirler. Ayrıca, saponinlerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel faydaları ve toksisiteleri nedeniyle tıbbi ve farmasötik alanlarda önemi artmıştır (Wang ve ark., 2024).

Fenolik bileşikler, yapılarında bir fenol grubu bulunduran fenol aromatik bir halkaya eklenmiş hidroksil grubunu oluşturan bileşiklerdir. Bir veya birden çok hidroksil grubunun bağlı olduğu benzen halkasının bileşenler grubuna verilen addır. Diğer bir tanıtımda ise, aromatik halkalarda çok miktarda hidroksil substitüenti bulunduran bileşiklerin tamamına fenolik bileşikler denir. Fenolik bileşiklerin diğer adı da polifenollerdir (Barzkar ve ark., 2024).

Fenolik bileşiklerin işlevlerinden bazılarını aşağıda yer verilmiştir.

- Antimikrobiyal ve antioksidatif etkileri gösterir,
- Çeşitli gıdalarda saflık kontrol kriteri oluşturur,
- Fenoloksidaz enzimlerin etkisiyle enzimatik renk esmerleşmesine sebep olur,
- Koku ve tat oluşumunu etkiler,
- Renk oluşumuna katılır (Yıldırım, 2019).

Kumarin; bitkilerde bulunan ve oksijenli heterosiklik bileşiklerin grubunu oluşturan laktonlara verilen addır. Kumarin ve kumarin türevleri, serbest veya heterozit halinde yaygın olarak bulunan biyolojik aktivitelerinden dolayı son yıllarda önemini artırmış doğal maddelerdir. Günümüzde 800'e kadar kumarin türevi bileşikler elde edilmiştir (Carneiro ve ark., 2021). Ayrıca kumarinler çeşitli biyolojik aktiviteleri ve yapısal çok yönlülükleri ile umut verici terapötik ajanlar olarak bilinmektedir (Hussain ve ark., 2024).

Tanenler; bitkinin kök, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunan polifenolik bileşenlerdir. Ayrıca, bu bileşik dokuların gelişmesine yardımcı olmakta ve bitki köklerini patojenlerin istilasından korumaktadır (Ribeiro ve ark., 2022). Tanenler insan sağlığı açısından önemli olmasına rağmen hayvanlar açısından öldürücü olmaktadır. Çünkü tanenler, proteinlerin sindirilmesini engellemektedir. Bu nedenle tanen içeriği yüksek besinleri hayvanlar anlamakta ve tüketmemektedir (Yıldırım, 2019).

Lignanlar; alkol ve sinapil alkolden oluşan monolignollerin oluşturduğu dimerlerdir. Bu bileşik bağırsak sistemini güçlendirmeleri ve antiviral antialerjik etkileri nedeniyle son yıllarda insanların ilgi odağı olmuştur. Bu bileşik, doğada serbest halde bulunan ve stibenlerle yakın özellik gösteren bileşiklerdir (Cong ve ark., 2017).

Antosiyaninler; Latince mavi ve çiçek anlamına gelen, izole edilen ve baharatlara pembeden mora değişen renkler veren maddenin genel adıdır. Doğada 16 farklı antosiyanidin bileşiği bulunmakta ve bu bileşiğin savunma, tozlaşma ve üreme fonksiyonlarında çeşitli görevleri bulunmaktadır (Anonima, 2016).

İzaflavonoidler; bazı meyve ve sebzelerde bulunan fitoöstrojenlerin alt grubuna dahil olan bitkisel formdaki bileşiklere verilen addır. Meme kanseri riskini azaltan bu bileşiklerin başlıcaları; daidzein, genistein ve glisitein'dir (Yıldız ve Yıldız, 2022).

Flavonoller; stabilizasyonu desteklediğinden dolayı medikal tıpta kullanılan ve yumurtalık kanserinde de tedavi edici özelliği olan bir bileşiktir (Nam ve ark., 2015).

Flavonoller; kateşinler, adı ile de anılan flavonoller flavonoid grubunda yer alan renksiz bileşiklerdir ve neredeyse tüm meyvelerde bulunurlar. Gıda ürünlerinde en yaygın rastlanan flavonoid grubu olmalarının yanı sıra, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak da işlev görürler. Flavonoller, yapılarındaki C3 atomunda bir hidroksil grubu barındırmaları nedeniyle flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Yapılarında bulunan üç asimetrik karbon atomu nedeniyle dört farklı izomere sahiptirler. Flavonoller ve epimerleri, süperoksit anyon radikallerini doğrudan yok edebilen güçlü antioksidan özellikleriyle de bilinirler (Aron ve Kennedy, 2008; Mendonça ve ark., 2022). Flavonoller hem kimyasal hem de enzimatik açıdan havada bulunan oksijen (O₂) ile oldukça kolay reaksiyona girerler. Bu reaksiyonun

sonucu olarak, yoğun bir şekilde proantosiyanidinler oluşur (Yıldız ve Yıldız, 2022).

Baharatlar, geçmişten günümüze çeşitli şekillerde baharatın tanımı yapılmıştır. Baharat kelimesinin kökü "bahar" kelimesine dayanmaktadır. Arapça kökenli olan "bahar" kelimesi "koku" anlamına gelmektedir ve "baharat" kelimesi çoğul ek alarak "kokular" anlamında kullanılmaktadır (Yerasimos, 2014). Baharat, farklı oranlarda kokuya sahip olan ve yemeklerin çeşnilendirilmesinde kullanılan aromatik maddeler olarak tanımlanır. Eşsiz lezzetleriyle yemeklere tat katarken, hoş, kuvvetli ve yakıcı tatlarıyla yiyecekleri lezzetlendiren ve hazmı kolaylaştıran maddeler olarak da bilinir (Gürsoy, 2012).

Baharatların kullanımı M.Ö 4000 yılına kadar uzanmaktadır. Bu dönemde baharatlar sadece yemeklerde değil, aynı zamanda çeşitli dini ayinlerde Tanrı ile bütünleşmek ve kötü ruhları uzaklaştırmak amacıyla tütsü olarak da kullanılmıştır. Mısır'da yapılan arkeolojik kazılarda, baharatların yemeklerde kullanımına dair yazılı kayıtlar bulunmuştur. Baharat ticareti, "Baharat Yolu" olarak bilinen güzergâh üzerinde gerçekleştirilmiş ve bu yolun kontrolü için çeşitli savaşlar yapılmıştır. Hatta bu yolun değiştirilmesi amacıyla Amerika kıtası keşfedilmiştir (Doğan ve Özdemir, 2022).

Türkiye, baharat ticaretinde stratejik bir konuma sahiptir. Baharatların ana vatanı Çin, Endonezya ve Hindistan olmasına rağmen, bazı baharat türleri Türkiye'de de yetiştirilmektedir (Kılıçhan ve Çulhan, 2015). Hasko (2023) tarafından yapılan çalışmada yer alan Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) ve Türkiye Cumhuriyeti (T.C) Tarım ve Orman Genel Müdürlüğü'nün verilerine göre; dünyada 2019 yılında toplam baharat üretimi 14.565.788 tondur. Türkiye'de 2020 yılında toplam baharat üretimi ise 361.544 tondur. Kırmızı biber 256.735 ton ile birinci sırada; defne 44.35 bin ton ile ikinci sırada; kekik 26.06 bin ton ile üçüncü sırada, anason 10.72 bin ton ile dördüncü sırada; rezene ise 4.37 bin ton ile beşinci sırada yer almaktadır. Ayrıca Gaziantep Ticaret Borsası (2021) raporunda ise; Türkiye çörekotu, defne, kekik ve sumak baharatlarıyla baharat ihracatında ilk sıradadır.

Terpenoid ve Fenolik Bileşen İçeren Baharatların Türk Mutfağında Kullanımı

Türk mutfağının çeşitliliği, tarih boyunca farklı kültürlerle yaşanan etkileşimler, geniş bir coğrafyada egemenlik sürmesi ve bu bölgede çeşitli kültürlerin bir arada bulunması gibi nedenlerle sağlanmıştır (Girgin ve ark., 2017). Türk mutfağında baharatların kullanımının 15. yüzyıldan sonra başladığı bilinmektedir. Baharatların yüksek maliyeti nedeniyle, başlangıçta yalnızca saray mutfaklarında kullanılmış, zamanla halk mutfağına da yayılmıştır (Sayılı ve ark., 2006). Türk mutfağı, yemek çeşitliliğinin yanı sıra tatlı çeşitliliği bakımından da oldukça zengindir (Durlu Özkaya ve Cömert, 2017; Demir, 2020). Bununla birlikte, günümüzde Türk mutfağında en çok anason, karabiber, karanfil, kekik, kırmızı biber, nane, tarçın, yenibahar ve zencefil kullanılmaktadır (Sayılı ve ark., 2006). Türk mutfağında yemeklerde kullanılan terponit ve fenolik bileşenli baharatlardan bazıları şunlardır: Anason; tatlımsı tadıyla genellikle pastalarda ve keklerde kullanılmaktadır. Bunun yanında, kompostoların, bisküvi, kurabiyelerin, süt ve süt ürünlerinin lezzetini artırmak için de kullanılmaktadır (Mete, 2017). Biberiye;

sert, keskin ve acımsı tadı vardır. Bu yüzden yemeklerde çok ölçülü kullanılmalıdır. Çorbalarda, et yemeklerinde, soslarda ve salatalarda kullanılmaktadır (Yalçın, 2000). Çörekotu; Türkiye’de Afyon, Amasya, Burdur, Gaziantep, Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş ve Mersin’de üretilmekte ve genellikle patates, baklagil, havuç, kabak, patlıcan, lahana gibi yemeklerde, börek, ekmek, kurabiye gibi hamur işinde, koyun ve tavuk etinde kullanılmaktadır (Yiğit, 2016). Haşhaş; genellikle fırında pişirilen unlu yiyeceklerde, salatalarda, makarnalarda, tavuk ve dana etiyle yapılmış yemeklerde lezzet verici olarak kullanılmaktadır. Havlıcan; taze ve kuru kökü kesilerek kullanılmaktadır. Taze havlıcan zencefil gibi soyularak ve dilimlenerek kullanılırken; kuru havlıcan ise karbonhidrat değeri yüksek kabak ve patates gibi sebzelerin yer aldığı yemeklerde kullanılmaktadır. Kakule; reçeller, hoşaf, şerbetler, kahveşer, dondurmalar, hamur işleri, pilavlar, baklagil yemeklerinde kullanılmaktadır (Mete, 2017). Karabiber; çorbalar, et-sebze yemekleri, salatalar ve kızartmalar olmak üzere hemen hemen tüm yemeklerde kullanılmaktadır (Ayyıldız ve Sarper, 2019). Karanfil; et ve et yemekleri ile turşu yapımında kullanılmaktadır (Gadekar ve ark., 2006). Kekik; çorbalar, dolmalar, balık, sos, peynir ve hamur işlerinde kullanılmaktadır (Ayyıldız ve Sarper, 2019). Kırmızı biber; kuru fasulye, lahmacun, kebab çeşitleri, et yemekleri ve birçok yemekte kullanılmaktadır. Türkiye’de en fazla kullanılan baharattır (Mete, 2017). Kimyon; ülkemizde özellikle et yemeklerinde, köftelerde ve dolmalarda kullanılır. Almanya’da çöreklerde, Fransa’da likör yapımında ve Hollanda’da ise peynire aroma vermesi amacıyla kullanılmaktadır (Yıldız ve Midilli, 2023). Kışniş;

yaprakları çorba, sos, salata, zeytinyağlı yemeklerde ve mezelerde kullanılmaktayken; tohumları ise, balık konservelerinde, turşularda ve salamuralarda aroma katmak için kullanılmaktadır (Ayyıldız ve Sarper, 2019). Köri; çorba ve makarnalarda kullanılmaktadır. Mercanköşk; makarna, tavuk ve salatalarda aroma katması için kullanılmaktadır. Muskat; genellikle soslar ve salatalarda aroma katması amacıyla ölçülü şekilde yemeklere rendelenen bir baharattır (Mete, 2017). Nane; çorbalarda, dolmalarda ve yoğurda katılmaktadır (Ayyıldız ve Sarper, 2019). Rezene; yumurtalarda, turşularda, balık yemeklerinde kullanılmaktadır. Ayrıca rezene çayı da içilmektedir (Mete, 2017). Safran; Türkiye’de sadece Safranbolu’da tarımı yapılmakta, çorbalarda, pilavlarda, tatlılarda, tavuk ve et yemeklerinde kullanılmaktadır (Velasco-Negueruela, 2001). Sumak; zeytinyağlı soslarda, sarma ve dolmalarda ekşi tat vermesi amacıyla kullanılmaktadır (Mete, 2017). Tarçın; çorbalarda, balıklarda, pilavlarda ve şerbetlerde kullanılmaktadır (Güldemir ve Işık, 2012). Tarhun; çorbalarda, balık-tavuk ve et yemeklerinde, salata ve soslarda kullanılmaktadır (Mete, 2017). Yenibahar; et yemeklerinde, köftelerde ve dolmalarda kullanılmaktadır (Yıldız ve Midilli, 2023). Zencefil; çorbalarda, et yemeklerinde, dolmalarda, salamuralarda, pasta ve çöreklerde, likör, turşu ve reçellerde kullanılmaktadır (Ayyıldız ve Sarper, 2019). Zerdeçal; çorba, turşu ve et yemeklerinde kullanılmaktadır (Ceyhun Sezgin ve Karaman, 2021; Kavrut, 2023).

Aşağıdaki çizelgede terponit ve fenolik bileşenli baharatlarla yapılmış Türk mutfağına ait yemeklerin isimleri yer almaktadır.

Çizelge 1. Türk mutfağına ait terponit ve fenolik bileşen içeren baharatlarla yapılmış yemekler

Table 1. Dishes made with spices containing terpenoid and phenolic components from Turkish cuisine

Çorbalar	Balık çorbası, buğday çorbası, mercimek çorbası, patates çorbası, tavuk çorbası, analı kızılı
Sebze yemekleri	Kapuska, pazı borani, patlıcan bastı
Dolmalar/Sarmalar	Kavun dolması, tavuk dolması, vişneli yaprak sarması
Pilavlar	Nohutlu pilav, acem pilavı, patlıcanlı pilav, Özbek pilavı, iç pilavı, domates pilavı, soğan pilavı
Kebaplar	Gömlek kebabı, süt kebabı, tavuk külbastı
Yahniler	Papaz yahnisi, sarımsaklı yahni
Hamur İşleri	Soğan böreği, mantı, tavuk böreği
Tatlılar	Cevizli tel kadayıf, tavuk göğsü, zerde, ayva ve armut tatlısı

Kaynak: Ayyıldız ve Sarper, 2019; Yiğit ve Samav, 2020; Özilgen ve Samancı, 2020; Sabbağ ve Boğan, 2019.

Materyal ve Yöntem

Araştırma Yöntemi ve Örneklemi

Bu çalışmada verilerin toplanmasında sistematik literatür taraması ve veri tabanı analizine dayalı kantitatif bir araştırma yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada Türk mutfağında kullanılan baharatların fonksiyonel bileşenler açısından literatürdeki yeri araştırılmıştır. Araştırmanın sınırlılıkları kapsamında baharatlar fonksiyonel bileşenler grubundan terpeonitler ve fenolik bileşenler olarak iki temel grupta değerlendirilmiştir. Literatür araştırması sonucunda son beş yıl içinde Türk mutfağı üzerine yapılan baharat araştırmalarına yönelik bir literatür incelemesi gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda en sık kullanılan 24 baharat belirlenmiştir.

Araştırma Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında, baharatların özellikleri son on yıldaki Pubmed ve ScienceDirect veritabanlarındaki

çalışmalardan derlenmiştir. İçinde bulunan etken maddeler, USDA (U.S. Department of Agriculture) ve TÜRKOMP (Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı) veri tabanlarındaki besinlerin 100 gramı üzerinden elde edilmiştir. Antioksidan ve ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) değerleri ise BEBİS 9.0 (Beslenme Bilgi Sistemi) beslenme programı kullanılarak besinin 100 gramı üzerinden hesaplanmıştır.

Etik Değerlendirme

Çalışma kapsamında herhangi bir canlıdan (insan/hayvan) herhangi bir müdahale (girişimsel müdahale ya da anket ile veri toplama) ile veriler toplanmamıştır. Veriler ulusal ve uluslararası beslenme veri tabanlarından elde edilmiştir. Bu sebeple çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

Bulgular

Elde edilen bilgiler doğrultusunda Türk mutfağında kullanılan baharatların özellik, etken madde, miktar, antioksidan ve ORAC değerleri Çizelge 2a, 2b, 2c, 2d ve 2e’de özetlenmiştir. Çizelge 2a-e değerlendirildiğinde terpenoidler ve fenolik bileşikler açısından en zengin olan baharatlar sırasıyla anason, haşhaş, tarçın, karabiber, kekik, kişniş ve sumak olduğu görülmüştür. Baharatlarda en yaygın görülen fonksiyonel bileşenler ise sırasıyla karoten (alfa, beta ve gama) (15 tanesinde), filokinon (11 tanesinde), tokoferol (alfa, beta ve gama) (10 tanesinde), lutein (9 tanesinde) ve betain (8 tanesinde) olarak

bulunmuştur. Erişilebilen değerler arasında toplam fenolik madde miktarları (TFM) değerlendirildiğinde en fazla TFM değeri köri baharatında görülmüştür. Bu baharatı havlıcan ve çörekotu takip etmektedir. Antioksidan aktivite değerleri incelendiğinde erişilebilir değerler arasında en yüksek değer sumakta görülmüştür. Sumağı karanfil ve mercan köşkü takip etmektedir. ORAC değerleri incelendiğinde ise erişilebilir değerler arasında en yüksek değer karanfildedir. Karanfil mercan köşkü, biberiye, kekik, zerdeçal ve çörekotu takip etmektedir.

Çizelge 2a. Terpenoid ve Fenolik Bileşenlerce Baharatların Etken Madde ve Özellikleri

Table 2a. Active Compounds and Properties of Spices in Terms of Terpenoid and Phenolic Components

Anason (<i>Pimpinella anisum</i>); Kaynak: Sun ve ark (2019) VT: USDA; TFM: 352 mg GAE; AAD: 18,9 mmol; ORAC: 428,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Kateşin Epikateşin Ellagik asit Pirogallol P-Kumarik asit Protokatekuik Klorojenik asit Gallik asit Alfa-Kumarik Katekol Ferulik asit 	<ul style="list-style-type: none"> 71,68 mg 11,38 mg 10,64 mg 6,29 mg 5,01 mg 1,98 mg 11,85 mg 60,75 mg 18,75 mg 21,91 mg 36,63 mg 	İran, Hindistan ve Türkiye'ye özgü olan anason hem meyve hem de tohum için yetiştirilen, yıllık otsu bir bitkidir. Anasonun genellikle kuru kayalık yerlerde, kayalık yarıklarda, tarlalarda, çayırlarda, dağ meralarında ve otlaklarda yetişmektedir.
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>); Kaynak: Nieto ve ark (2018) VT: TURKOMB; TFM: 222,05-606,06 mg GAE; AAD: 5,013-35,8 mmol; ORAC: 165280,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Karoten Karnosol Karnosik asit Rosmarinik asit Betulinik asit Ursolik asit 	<ul style="list-style-type: none"> 1,9 mg 	Akdeniz bölgesinin kuzey ve güney kıyılarında yetişir. Grimsi yeşil yaprak dökmeyen çok yıllık bir bitkidir ve aromatik çalı şeklinde büyür. Yaprakları dar, doğrusal ve koyu yeşildir. Çiçekleri koyu maviden pembe ve mora kadar değişen tonlarda olabilir. Biberiyenin kendine özgü bir çam-odunsu kokusu ve taze acı-tatlı bir tadı vardır.
Çörekotu (<i>Nigella sativa</i>); Kaynak: Buran ve ark (2022) VT: TURKOMB; TFM: 3918 mg GAE; AAD: 7,41 mmol; ORAC: 118400,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Alfa-tokoferol 	<ul style="list-style-type: none"> 3,8 mg 	Akdeniz bölgesinde yetişen tek yıllık bitkidir ve özellikle Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Güneydoğu Avrupa ülkelerinde bulunur. Genellikle tohumları bütün olarak, toz şeklinde veya oleoresin özütü olarak yiyeceklerin tatlandırılmasında kullanılır.
Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i>); Kaynak: Hill (2019). VT: USDA; TFM: 1,01-65,95 mg GAE; AAD: 0,40-43,90 mmol; ORAC: 481,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Betain Alfa-tokoferol Beta-tokoferol Gama-tokoferol Delta-tokoferol Alfa- tokotrienol, Gama-tokotrienol Stigmasterol Campesterol Beta-sitosterol 	<ul style="list-style-type: none"> 0,9 mg 1,77 mg 8,3 mg 8,82 mg 0,23 mg 0,15 mg 0,13 mg 7 mg 29 mg 109 mg 	Batı Asya, Doğu Avrupa ve Türkiye’de üretilmektedir. Tüylü, küçük ince kökler ve dik seyrek dallı gövdelere sahiptir. Morumsu siyah veya kirli beyaz tohum çeşitleri vardır. Fındık aromasına sahiptir.

Çizelge 2b. Terpenoid ve Fenolik Bileşenlerce Baharatların Etken Madde ve Özellikleri

Table 2b. Active Compounds and Properties of Spices in Terms of Terpenoid and Phenolic Components

Havlican (<i>Alpinia officinarum</i>); Khairullah ve ark (2020) VT: TURKOMB; TFM: 1136- 4927,8 mg GAE; AAD: 2,8 mmol; ORAC: 525,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> • Alfa-tokoferol • Kateşin • Mirisetin • Kuersetin • Kaemferol • Kurkumin • Galangin • Asasetin • Kaemferid • Epikateşin 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,45 mg • 0,73 mg • 14,60 	Endonezya'ya özgü çok yıllık bir bitkidir. Tayland ve Endonezya başta olmak üzere Asya'nın birçok yerinde yetiştirilmektedir. Odunsu, naneli ve çiçeksi bir aromatiği mevcuttur. Köksapı geleneksel tıpta geniş bir uygulama alanına sahiptir.
Kakule (<i>Elettaria cardamomum</i>); Kaynak: Hill (2019) VT: TURKOMB; TFM: 145 mg GAE; AAD: 1,5-2,3 mmol; ORAC: 2764,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> • Protokatekuik asit • Gentisik asit • Syringic asit • Ferulik asit • Rutin • Feruloil Kinik Asit 	<ul style="list-style-type: none"> • 23,48mg • 1,14 mg • 34,11 mg • 8,51 mg • 0,57 mg • 0,97 	Kakule dünyadaki egzotik baharatlardan biridir. Otsu bir bitkinin kurutulmuş meyvesidir. Zencefil familyasından Zingiberaceae'ye ait çok yıllık bitkidir. Hindistan ve Guatemala'da yetiştirilmektedir. Malabar, Mysore ve Vazhukka, isimli üç doğal çeşidi vardır.
Karabiber (<i>Piper nigrum</i>); Kaynak: Dosoky ve ark (2019) VT: TURKOMB; TFM: 708 mg GAE; AAD: 7.6 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> • Betain • Beta karoten • Alfa karoten • Beta Kriptoksantin • Likopen • Lutein +zeaksantin • Alfa-tokoferol • Gama-tokoferol • Alfa- tokotrienol, • Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> • 8,9 mg • 310 mcg • 12 mcg • 25 mcg • 20 mcg • 454 mcg • 1,04 mg • 6,56 mg • 0,85 mg • 164 mcg 	Tropik bölgelerin ürünü olan karabiber, ekonomik açıdan dünyanın en önemli ve en yaygın kullanılan baharatlarından. Yeşil olgunlaşmamış meyveleri güneşte kurutulduğunda siyahlaşarak buruşmaktadır. Keskin bir tada ve kokuya sahiptir.
Karanfil (<i>Eugenia caryophyllata</i>); Kaynak: Opara, E. I. ve Chohan, M. (2021) VT: TURKOMB; TFM: E; AAD: 175,3 mmol; ORAC: 290283,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> • Betain • Beta karoten • Beta Kriptoksantin • Alfa-tokoferol • Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,4 mg • 45 mcg • 103mcg • 8,82 mg • 142 mcg 	Karanfil, Maluku Adaları'na özgü olan bir bitkidir ve deniz seviyesinden 200 m yükseklikteki kıyı bölgelerinde yetiştirilir. Kurutulmuş karanfil, <i>Syzygium aromaticum</i> bitkisinin çiçek tomurcuğunun ve tohumunun koyu kırmızı ile kahverengi renktedir. Keskin bir tada ve kokuya sahiptir.
Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>); Kaynak: Opara ve Chohan (2021) VT: TURKOMB; TFM: 254,49-810 mg GAE; AAD: 63,1 mmol; ORAC: 157380,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> • Betain • Beta karoten • Alfa karoten • Gama-tokoferol • Delta-tokoferol • Beta Kriptoksantin • Lutein +zeaksantin • Alfa-tokoferol • Filokinon • Karvakrol 	<ul style="list-style-type: none"> • 9,8 mg • 2260 mcg • 20 mcg • 24,4 mg • 0,92 mg • 33 mcg • 1900 mcg • 7,48 mg • 1710 mcg 	Güney Avrupa ve Akdeniz bölgesine özgü olmasına rağmen, ılıman iklimlere sahip birçok yerde bulunabilir. Kekik türleri, küçük ve aromatik yapraklara sahip çalılardır. Yaz başında beyaz veya pembe çiçekler açarlar. İyi drene edilmiş alkali veya nötr topraklarda yetişir ve güneş alan yamaçlarda iyi gelişir.

Çizelge 2c. Terpenoid ve Fenolik Bileşenlerce Baharatların Etken Madde ve Özellikleri

Table 2c. Active Compounds and Properties of Spices in Terms of Terpenoid and Phenolic Components

Kırmızı Biber (<i>Capsicum frutescens</i>); Kaynak: Kabak ve Dobson (2017) VT: TURKOMB; TFM: 1261,62 mg GAE; AAD: E; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Beta Kriptoksantin Lutein +zeaksantin Alfa-tokoferol Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 21800 mcg 6250 mcg 13200 mcg 29,8 mg 80,3 mcg 	Kırmızı biber, Capsicum cinsine ait olan bir bitkidir. Dünyanın farklı yerlerinde chillis, Chile, Hot Peppers, Bell Peppers, Red Peppers, Pod Peppers, Cayenne Peppers, Paprika, Pimento ve Capsicum olarak adlandırılmaktadır. Kırmızı biber, kapsaisin adlı maddenin az miktarlarda bulunduğu veya hiç bulunmadığı ve öncelikle rengi için yetiştirilen bir türdür. Geleneksel olarak, taze kırmızı biberlerin hasat sonrası yıkanması ve kurutulmasıyla biberlerin kabukları bütün olarak bırakılır, küçük pullar halinde işlenir veya toz haline getirilir.
Kimyon (<i>Cuminum cyminum</i> L.); Kaynak: Mohammed ve ark. (2024) VT: USDA; TFM: 337 mg GAE; AAD: 3,6-6,8 mmol; ORAC: 50372,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Lutein +zeaksantin Alfa-tokoferol Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 762 mcg 448 mcg 3,33mg 5,4 mcg 	Kimyon Cuminum familyasına ait türlerin genel yayılış alanı Mısır'dır. Ancak Orta Doğu, Hindistan, Çin ve Akdeniz bölgelerinde de dağılımının mevcut olduğu görülmüştür. Bitkinin boyu 10 ile 50 cm arasında değişmekte olup tabanında çatallı ve tüysüz bir sap bulunmaktadır. Yapraklar tüylerden yoksundur ve alt kısımları tipik olarak ince tüylüdür ve çoğunlukla üç yapraktan oluşur.
Kişniş (<i>Coriandrum sativum</i>); Kaynak: Balasubramanian ve ark. (2016) VT: USDA; TFM: 312 mg GAE/g; AAD: 0,3 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Alfa karoten Beta Kriptoksantin Lutein +zeaksantin Alfa-tokoferol Filokinon Stigmasterol Beta-sitosterol 	<ul style="list-style-type: none"> 3930 mcg 36 mcg 202 mcg 865 mcg 2,5 mg 310 mcg 3 mg 2 mg 	Doğu Akdeniz ve Orta Asya'ya özgü olan kişniş Kuzey Amerika'da görülmektedir. Umbelli- ferae familyasına ait tek yıllık yumuşak, tüysüz ve otsu bir bitkidir. 60 cm'ye kadar uzayabilir. Meyvesi küre şeklinde (3-5 mm çapında) ve her biri iki tohum içermektedir.
Köri (<i>curry</i>); Kaynak: Bhusal ve Thakur (2021) VT: USDA; TFM: 5400- 8398 mg GAE; AAD: E; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Betain Beta karoten Alfa-tokoferol Gama-tokoferol Filokinon Kuersetin Miresetin Kamefrol 	<ul style="list-style-type: none"> 28,8 mg 11 mcg 25,2 mg 1,15 mg 99,8 mcg 	Köri kelimesi, Hintçe de "turcurri" kelimesinin kısaltılarak "turri" daha sonra İngilizcede "curry" olarak çevrilen bir kelimedir. Köri aslında aşçılık anlamına gelir, ancak zamanla soslar için kullanılan genel bir terim haline gelmiştir ve bölgeden bölgeye değişik bileşimlere sahiptir. Hintliler için köri, sadece bitkilerin ve baharatların toz haline getirilmiş karışımı değildir, aksine seçilmiş baharatların ustalıkla bir araya getirilerek her yemek için özel bir karışım yapılmasıdır.
Mercan Köşk (<i>Origanum majorana</i>); Kaynak: Opara ve Chohan (2021) VT: USDA; TFM: 520 mg GAE; AAD: 142,9 mmol; ORAC: 175295,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Beta Kriptoksantin Lutein +zeaksantin Alfa-tokoferol Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 4810 mcg 70 mcg 1900 mcg 1,69 mg 622 mcg 	Güney Avrupa ve Kuzey Afrika'ya özgüdür. Görünüş ve aroma olarak kekikle yakından ilişkilidir; mercanköşklerin kekiklerden daha hassas bir tada sahip olduğu düşünülmektedir. Mercanköşk, kokulu oval şekilli, beyazımsı veya grimsi-yeşil renklerinde yaprakları vardır. Küçük beyaz veya soluk pembe renge sahip çiçek kümeleri ile yaklaşık 60 cm kadar büyüyen çok yıllık bitkilerdir.
Muskat (<i>Myristica fragrans</i>); Kaynak: Beckerman ve Persaud (2019) VT: USDA; TFM: 112 mg GAE; AAD: 33,0 mmol; ORAC: 69640,0		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Beta Kriptoksantin Gama-tokoferol 	<ul style="list-style-type: none"> 28 mcg 66 mcg 0,53 mg 	İlk kez 1512 yılında Portekizliler tarafından Endonezya'nın Banda Adaları'nda keşfedilmiştir. Hindistan cevizi ağacının kabuğundan ve tohum örtüsünden çıkarılmış tohum çekirdeği olan baharattır. Tohum çekirdeği sarı renklidir.

Çizelge 2d. Terpenoid ve Fenolik Bileşenlerce Baharatların Etken Madde ve Özellikleri

Table 2d. Active Compounds and Properties of Spices in Terms of Terpenoid and Phenolic Components

Nane (<i>Mentha spicata</i>); Kaynak: Mahendran ve Rahman (2020) VT: TURKOMB; TFM: 356,73-1637mg GAE; AAD: 3,088-6,559 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Lutein 	<ul style="list-style-type: none"> 7166 mcg 3178 mcg 	Lamiaceae familyasına ait çok yıllık, tüysüz ve güçlü kokulu bir bitkidir. Ticari değeri ve belirgin aroması nedeniyle Avrupa, Asya, Amerika Birleşik Devletleri ve Akdeniz ülkelerinin ılıman bölgelerinde yetiştirilir. Yapraklar dikdörtgen mızrak şeklinde, karşılıklı dizilmiş, tırtıklı kenarlara sahiptir. Koyu yeşil, gri-yeşil, mor-mavi gibi çeşitli renklerde mevcuttur.
Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>); Kaynak: Rafieian ve ark. (2024) VT: TURKOMB; TFM: 347-371 mg GAE; AAD: 2,3 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Beta karoten Lutein 	<ul style="list-style-type: none"> 3746 mcg 4833 mcg 	Apiaceae (Umbelliferaeae) familyasının bir üyesi olup, oluklu gövdeleri, aralıklı yaprakları, kılıflı yaprak sapı, genellikle biseksüel çiçeği ve sarı şemsiyesi olan dayanıklı ve çok yıllık bir bitkidir. Rezene, genellikle Akdeniz kıyılarına özgü olduğu düşünülen tipik bir aromatik bitki olmasına rağmen, dünyanın birçok bölgesinde yaygınlaşmış ve uzun zamandır tıbbi ve mutfak bitkisi olarak kullanılmaktadır.
Safran (<i>Crocus sativus</i>); Kaynak: VT: TURKOMB; TFM: 45 mg GAE; AAD: 2,0-61,7 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Karoten Krosetin Pikrokrosin Safranal Kuersetin Naringenin Kateşin Vanilik asit 	<ul style="list-style-type: none"> 0,4 mg 	Dünyanın en pahalı baharatı olan safran Doğu Akdeniz, Asya ve İran'da ortaya çıktığına inanılmaktadır. Safran ismi Arapça "faran" sarı olmak kelimesinden türetilmiştir. Bitkinin çiçeklenmesi genellikle sadece dört ila beş hafta sürer ve geleneksel yöntem olan elle toplanmaktadır. Bir kuru stigma yaklaşık 2 mg ağırlığında olduğundan ve her çiçekte bunlardan üç tane bulunduğundan, 1 kg baharat üretimi için yaklaşık 150.000 çiçeğin dikkatlice toplanması gerekir.
Sumak (<i>Rhus coriaria</i>); Kaynak: Altıok ve ark. (2006); Romeo ve ark. (2015); Aytar ve ark. (2024) VT: TURKOMB; TFM: 15-286 mg GAE; AAD: 1050 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Delfinidin Siyanidin G İzokersetin Mirsetin Protokateşik P-Hidrosibenzoik Elajik Vanilik Asit Gallik asit 	<ul style="list-style-type: none"> 0,34mg 123 mcg 345mcg 421 mcg 1,23 mg 2,4 mg 0,28 mg 0,14 mg 2353 mg 	Sumak, doğal bir şifa kaynağı olan bir bitkidir. Genellikle ılıman ve tropikal iklimlerde yetişir. Bu bitkiler, yol kenarları, yamaçlar, çalılık ve ormanlık alanlar gibi çeşitli habitatlarda kendiliğinden yetişebilirler. Türkiye'de genellikle batı ve güney bölgelerinde sıklıkla gözlemlenirken, aynı zamanda Marmara ve Karadeniz kıyılarında da görülebilmektedir. Yabani olarak yetişen sumak yaklaşık 1 metre yüksekliğinde küçük bir çalı bitkisidir.
Tarçın (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>); Kaynak: Spence (2023) VT: USDA; TFM: 998 mg GAE; AAD: 13.2-31.6 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Betain Beta karoten Alfa karoten Beta Kriptoksantin Likopen Lutein +zeaksantin Alfa-tokoferol Gama-tokoferol Delta-tokoferol Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 3,9 mg 112 mcg 1 mcg 129 mcg 15 mcg 222 mcg 2,32 mg 10,4 mg 0,26 mg 31,2 mcg 	Tarçın Yunanca tatlı anlamına gelen kinnámōmon sözcüğünden türetilmiştir. Güney Doğu Asya, Çin ve Avustralya'da yaklaşık 250 türü mevcuttur. Tarçın ağacı, doğal ortamında 7 metreye kadar büyüeyen ve yaprak dökmeyen tropikal bir ağaçtır. Yetiştirme altında ise bitki daha çok çalı olarak yetiştirilerek boyu 3 metrenin altına düşürülmektedir. Kalın ve güçlü bir kabuğa olan tarçın, hoş bir kokuya ve aromatik tada sahiptir.

Çizelge 2e. Terpenoid ve Fenolik Bileşenlerce Baharatların Etken Madde ve Özellikleri

Table 2e. Active Compounds and Properties of Spices in Terms of Terpenoid and Phenolic Components

Tarhun (<i>Artemisia dracunculus</i>); Kaynak: Aglarova ve ark (2008); Harşit (2015) VT: TURKOMB; TFM: 268.1-408 mg GAE; AAD: 5.2-43.3 mmol; ORAC: E		
Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Karoten Mirtenol 	<ul style="list-style-type: none"> 2,5 mg 	Tarhun <i>Artemisia Dracunculus</i> ismi ile anılmaktadır. Latince “küçük ejderha” anlamına gelen “dracunculus” kelimesinden türetilmiştir ve yapraklarının görünümü ejderha dilini anımsatır. Amerika, Asya ve Avrupa'da yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. Bitkinin hammaddesi olan kurutulmuş yapraklar, yoğun ve aromatik bir kokuya sahiptir. 150 cm yüksekliğe kadar ulaşan tüysüz çok yıllık bir bitkidir. Düz gövdeli ve alt kısımlarında çiçek yoktur. Yapraklar sapsızdır. Alt yapraklar tepe noktasında üç parçalı, orta ve üst yapraklar ise mızrak şeklindedir.

Yenibahar (*Pimenta racemosa*); Kaynak: Pilla ve ark. (2024)

VT: TURKOMB; TFM: E; AAD: 8.05-50 mmol; ORAC: E

Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Karoten kuersetin, kuersitrin kaempferol kateşin naringenin 	<ul style="list-style-type: none"> 0,3 mg 	Myrtaceae familyasına ait olan yenibahar İngilizce'de allspice veya pimento olarak geçmektedir. Pimento kelimesi İspanyolca da karabiber anlamına gelen pimienta kelimesinden türetilmiştir. Yenibahar karabibere benzediği için, birçok dilde biber olarak bilinmektedir. Jamaika, Küba ve Orta Amerika'da yaygın olarak yetiştirilmektedir. Yaprak dökmeyen 10 m yüksekliğe kadar büyüeyebilen bir bitkidir. Yaprakları yaklaşık 15 cm uzunluğunda ve 4 cm genişliğindedir. Yaprakların üstü koyu yeşil, altı ise aroma yüklü soluk yeşil renktedir.

Zencefil (*Zingiber officinale*); Kaynak: Zhang ve ark. (2021)

VT: USDA; TFM: 108 mg GAE; AAD: 20,35 mmol; ORAC: E

Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Betain Beta karoten Gama-tokoferol Filokinon Dihidrofilokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 3,4 mg 18 mcg 3,01 mg 0,8 mcg 2,4 mcg 	Zingiberaceae familyasına dahil bir türdür. Bu familya 24 cinsi ve yaklaşık 300 türü kapsar. Zencefil bitkisi çok yıllık yumrulu kökler halinde oluşmaktadır. 60 cm boyunda, koyu renkli yeşil yaprakları vardır. Bitki tüm dünyada yetiştirilmektedir. Ancak Hindistan, Bangladeş, Tayvan, Jamaika ve Nijerya gibi sıcak iklime sahip ülkelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir.

Zerdeçal (*Curcuma longa L.*); Kaynak: Jikah ve Edo (2024)

VT: USDA; TFM: 96,4 mg GAE; AAD: 7,1-10,3 mmol; ORAC: 127068,0

Etken madde	Miktar (100g)	Özellikleri
<ul style="list-style-type: none"> Betain Alfa-tokoferol Beta-tokoferol Gama-tokoferol Alfa-tokotrienol, Gama-tokotrienol Filokinon 	<ul style="list-style-type: none"> 9,7 mg 4,43 mg 0,01 mg 0,72 mg 0,12 mg 0,05 mg 13,4 mcg 	Halk arasında “altın baharat” olarak bilinmektedir. Güneydoğu Asya ülkelerinden gelen Zingiberaceae ailesine ait dik, yapraklı çok yıllık bir bitkinin rizomatöz köklerinden elde edilir. “Hindistan'daki Vedic kültüründe 4000 yıl kadar öncesine dayanır ve hem yemek baharatı olarak hem de bazı dini amaçlarla kullanılmıştır. Kısa saplı büyük dikdörtgen yapraklı, oval, piriform veya dikdörtgen rizomlar taşıyan, genellikle dallanmış ve kahverengi renginde çok yıllık bir bitkidir.

VT: Veritabanı; TFM: Toplam Fenolik madde (100g); AAD: Antioksidan Aktivite Değeri (100 g)(mmol ya da % cinsinden); *E: Erişilememiştir;

*USDA: U.S. Department of Agriculture; *TURKOMB: Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı Araması; *BEBİS 9.0: Beslenme Bilgi Sistemi

Çizelge 3. Baharatların toplam antioksidan aktivite değeri, ORAC ve toplam fenolik bileşen değerleri

Table 3. Total antioxidant activity value, ORAC, and total phenolic component values of spices

Değişken	Minimum	Maksimum	Ortalama	S.S.
Antioksidan aktivite değeri (100 g) (mmol ya da % cinsinden)	0,30	1050,00	82,55	220,63
ORAC	428,00	290283,00	96493,00	91903,08
Toplam fenolik bileşen miktarı (mg GAE)	45,00	8398,00	1201,03	2026,83

Çalışma kapsamında değerlendirilen 24 baharatın toplam antioksidan aktivite değerleri, ORAC değerleri ve toplam fenolik bileşen değerleri incelendiğinde, çalışma kapsamında değerlendirilen baharatlarda toplam antioksidan aktivite değeri (100 g) (mmol ya da % cinsinden) en az 0,30 (kişniş), en fazla 1050 (sumak); ORAC değeri en az 428 (anason), en fazla 290283 (karanfil); toplam fenolik bileşen değeri en az 45 mg GAE (safran), en fazla 8398 mg GAE (köri) olarak görülmüştür (Çizelge 3).

Çalışma kapsamında Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan 24 baharatın toplam antioksidan aktivite, ORAC ve toplam fenolik bileşen değerleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, baharatın toplam antioksidan aktivite miktarı arttıkça ORAC değerinin de arttığı görülmektedir. Bu iki değer arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu görülmektedir ($p<0,001$) (Çizelge 4).

Çizelge 4. Baharatların toplam antioksidan aktivite, ORAC ve toplam fenolik bileşenlerin korelasyonu
 Table 4. The correlation between total antioxidant activity, ORAC, and total phenolic components of spices

Değişken	1	2	3
Antioksidan aktivite değeri (100 g) (mmol ya da % cinsinden) ¹	1		
ORAC ²	0,772** 0,003	1	
Toplam fenolik bileşen miktarı (mg GAE) ³	-0,133 0,576	-0,095 0,782	1

**p<0.01.

Tartışma

Bu çalışma, Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan baharatların terpenoidler ve fenolik bileşenler açısından kapsamlı bir değerlendirmesini sunmuştur. Elde edilen bulgular, incelenen baharatların yüksek miktarlarda fonksiyonel bileşen içerdiğini ve bu bileşenlerin sağlık üzerinde önemli olumlu etkiler yaratabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle anason, haşhaş, kekik, karabiber, tarçın, kişniş, sumak gibi baharatlar, zengin fenolik içerikleri ve terpenoid profilleri ile öne çıkmaktadır (Hill, 2019; Balasubramanian ve ark., 2016; Sun ve ark., 2019).

İncelenen bu baharatlarda en fazla görülen fonksiyonel bileşen karoten bileşenleridir (17 çeşitte). Karoten bileşenlerini (alfa ve beta), tokoferol (alfa, beta, gama ve delta) (15 çeşitte) ve filokinon (11 çeşitte) bileşenleri takip etmektedir. Karoten bileşenleri en fazla kırmızı biber (2180 mcg), nane (7166 mcg) ve mercan köşkte (4810 mcg) bulunmaktadır. Bu baharatları sırasıyla kişniş, rezene, tarhun, kekik, biberiye, kimyon, safran, karabiber, yenibahar, tarçın, karanfil, muskat, zencefil ve köri takip etmektedir. Tokoferol bileşenleri en fazla kekik (32,8 mg), kırmızı biber (29,8 mg) ve körیده (26,35 mg) bulunmaktadır. Bu baharatları sırasıyla haşhaş, tarçın, karanfil, karabiber, zerdeçal, çörekotu, kimyon, zencefil, kişniş, mercan köşkü, havlıcan ve muskat takip etmektedir. Filokinon ise en fazla kekik (1710 mcg), mercan köşkü (622 mcg), kişniş (310 mcg), karabiber (164 mcg), karanfil (142 mcg), köri (99,8 mcg) ve kırmızı biberde (80,3 mcg) bulunmaktadır. İncelenen baharatların toplam fenolik madde, antioksidan aktivite değeri ve ORAC değerleri incelendiğinde erişilebilen değerler arasında TFM değeri en fazla sırasıyla köri, havlıcan ve çörekotu baharatında olup; antioksidan aktivite değerleri ise sırasıyla en fazla sumak, karanfil ve mercan köşkünde olup; ORAC değerleri ise en fazla sırasıyla karanfil, mercan köşkü, biberiye, kekik, zerdeçal ve çörekotunda olarak görülmüştür. Bu bilgiler ışında Türk mutfağında zengin olarak kullanılan bu baharatların içerdikleri fonksiyonel bileşenler sayesinde vücudu hastalıklara karşı koruyucu özellikler gösterdikleri söylenebilir. Bu baharatlarla ilgili yapılmış çalışmalar şu şekildedir; sumak flavonoidler, flavonlar, antosiyaninler, tanenler, organik asitler, lif, proteinler, yağlar, nitritler ve nitratlar gibi besin maddeleri ve fitokimyasal bileşenleri nedeniyle eski çağlardan beri öğütülmekte, karıştırılmakta ve hem baharat hem de tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Aytar ve ark., 2024). Yapılan çalışmalar kekiğin içerdiği kimyasal bileşimi sayesinde antibakteriyel ve antifungal özellikler gösterdiğini bildirmektedir (Almaqtari ve ark., 2011; Saki ve Kalanter, 2014; Boskovic ve ark., 2015). Altıok ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada farklı baharatlar kullanılarak toplam fenolik bileşik miktarları belirlenmiştir. Buna göre en yüksek fenolik bileşik miktarını sumaktan elde ettikleri belirtilmiştir (Altıok ve ark., 2006). Et terbiyesinde

kullanılan kekik ve sumak baharatlarının antioksidan içerikleri, radikal giderme aktivitesi ve antimikrobiyal aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada ise, kekik baharatının sumaktan biraz yüksek total fenolik içeriğe sahip olduğu fakat total flavonoid içeriğinin ise sumakta kekikten yaklaşık olarak iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Faten ve El-Shehawey, 2013). Eski Yunan ve Romalılar döneminde biberiye, mutfaklarda baharat olarak kullanılması yanında tedavi amaçlı olarak da kullanılmıştır. Antik çağlardan beri hafızayı artırıcı etkisi olduğuna inanılan biberiye, Eski Yunanlılar tarafından hafızayı güçlendirmek ve konsantrasyonu artırmak amacıyla kullanılmıştır. Bunun artısında İkinci Dünya Savaşı sırasında mikrobiyolojik hastalıkların bulaşmasını engellemek amacıyla ve hastalıkları tedavi etmek için kurutulmuş halde biberiye dallarının yakıldığı belirtilmektedir. Yine 15. Yüzyılda insanların veba salgınından korunmak için biberiye kullandığı da bildirilmektedir (Haksel 2007). EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) 2008 yılında koruyucu olarak biberiye ekstraktının kullanılmasına onay vermiş ve biberiye ekstraktı E392 koduyla Avrupa Birliği Gıda Katkı Mevzuatı içine eklenmiştir (Anonimb, 2008). Yapılan çalışmalar biberiye ekstraktının kanser (Tai ve ark., 2012), oksidatif stres gibi durumları azalttığını ve anti-inflamatuvar etki (Lorenzo-Leal ve ark., 2019) gösterdiğini bildirmektedir. Betain bileşeninin haşhaş, karabiber, karanfil, kekik, köri, tarçın, zencefil ve zerdeçal da olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşen hem alkole bağlı hem de metabolik ilişkili karaciğer hastalıklarını önlemede rolü büyüktür. Aynı zamanda bağırsak bütünlüğünü ve yağ fonksiyonunu koruyarak ilerleyici karaciğer hasarını önemli ölçüde önleyebilmektedir (Arumugam ve ark., 2021). Çörekotu, haşhaş, havlıcan, karabiber, karanfil, kekik, kırmızı biber, kimyon, kişniş, köri, mercan köşk, tarçın ve zerdeçalda bulunan alfa-tokoferol, kalp hastalığı, kanser ve Alzheimer hastalığının önlenmesi ve tedavisinde etkinliğini göstermektedir (Tucker ve Townsend, 2005). Haşhaş, zerdeçal, karabiber, kekik, köri, muskat, tarçın ve zencefil de bulunan gama tokoferol, önemli antioksidatif ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğunu ve artan inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili kronik hastalık durumlarında önleyici bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Himmelfarb ve ark., 2003). Karanfil, kekik, kırmızı biber, kimyon, kişniş, köri, mercan köşk, muskat, nane, rezene, tarçın, zencefil ve karabiber de bulunan Beta Karaton, güçlü bir antioksidan kapasitesine sahiptir. Kalp hastalıkları ve belirli kanser türlerinin riskini azaltmak, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve yetişkinlerde geri dönüşü olmayan körlüğün önde gelen nedeni olan yaşa bağlı makula dejenerasyonundan korunmak gibi potansiyel faydalar sunmaktadır (Gül ve ark., 2015).

Bu bulgular, geleneksel Türk mutfağında kullanılan baharatların sadece gastronomik değerini değil, aynı zamanda sağlık üzerindeki olumlu etkilerini de vurgulamaktadır. Fonksiyonel bileşenleri içeren besinlerden bu kadar zengin olan bir mutfak kültürü, sağlıklı yaşamı desteklemek için önemli bir kaynak olarak değerlendirilebilir. Türk mutfağında Orta Doğu mutfakları kadar yoğun baharat kullanımı olmamasına rağmen fonksiyonel bileşenlerce zengin baharatlara yer vermesi sebebiyle insan sağlığını korucuyu, anti inflamuar ve anti kanserojenik etki gösteren bir mutfak olduğu söylenebilir. Ancak, bu baharatların sağlık üzerindeki etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için, biyoyararlanım ve biyoaktivite çalışmalarının daha da derinleştirilmesi gerekmektedir. Yöresel mutfak uygulamalarında bubaharatların kullanımlarına ne denli yer verildiklerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca Türkiye’de yetişen bu baharatların fonksiyonel bileşenlerinin daha net ifade edilebilmesi açısından gıda analizlerinin yapıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmalar, bu fonksiyonel bileşenlerin hangi baharatların hangi türlerinde daha yoğun bulunduğu ve sindirim sistemi üzerindeki etkileri ile vücuttaki biyoyararlanım süreçlerini daha detaylı incelemelidir. Ayrıca, bu bileşenlerin farklı pişirme ve işleme yöntemleri ile nasıl değiştiği, çiğ mi yoksa pişmiş mi tüketiminin etkisini artırdığı ve bu değişimlerin sağlık üzerindeki etkileri de önemli araştırma konuları olarak öne çıkmaktadır. Modern tıpta, beslenme uygulamaların ve yöresel yemek uygulamalarda bu baharatların daha etkin ve güvenli kullanımını sağlamak için yeni yöntemlerin geliştirilmesi önerilmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, Türk mutfağında kullanılan baharatların sağlık üzerindeki potansiyel faydaları göz önüne alındığında, bu baharatların Türk mutfağı uygulamaları kapsamında günlük beslenme alışkanlıklarına dahil edilmesi teşvik edilmelidir. Yöresel yemeklerin fonksiyonel bileşen içerik durumları incelenmelidir. Yapılacak olan pişirme uygulamalarının etkileri değerlendirilmelidir. Beslenme eğitimlerinde baharatların fonksiyonel içeriklerinden bahsedilmelidir. Bu yaklaşım, hem geleneksel mutfak kültürünün korunmasına katkı sağlayacak hem de bireylerin sağlıklı yaşam alışkanlıklarını sürdürülebilir hale getirecektir.

Beyanlar

Etik Beyan

Çalışma kapsamında herhangi bir canlıdan (insan/hayvan) herhangi bir müdahale (girişimsel müdahale ya da anket ile veri toplama) ile veriler toplanmamıştır. Veriler ulusal ve uluslararası beslenme veri tabanlarından elde edilmiştir. Bu sebeple çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

Yazar Katkı Beyanı

U.S.: Veri toplama, araştırma, resmi analiz ve orijinal taslağın yazılması

Ö.Ö.A.: Proje yönetimi, denetim, kavramsallaştırma, metodoloji, inceleme ve düzenleme

Fon Beyanı

Çalışma bir kurum ya da kuruluş tarafından finanse edilmemiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, raporlanan araştırma sonuçlarının herhangi bir kişi, kurum ya da kuruluş ile çıkar çatışması içermediğini beyan etmektedir.

Kaynaklar

- Aglarova, A. M., Zilfikarov, I. N. & Severtseva, O. V. (2008). Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) (review). *Pharm. Chem. J.* 42 (2), 81–86. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0064-3>
- Akanbong, E. A., Senol, A. & Devrim, A. K. (2021). Phenolic compounds for drug discovery: potent candidates for anti-cancer, anti-diabetes, anti-inflammatory and anti-microbial. *International Journal of Veterinary and Animal Research (IJVAR)*, 4(3), 115-121.
- Almaqtari, M.A., Saeed, M.A. & Ebtesam H. A. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turkish J. Biochem.*, 36: 342-349.
- Altok, D., Altok, E. & Bayraktar, O. (2006). Fonksiyonel gıda üretiminde kullanılan bazı baharatın antioksidan kapasiteleri. *Türkiye, 9. Gıda Kongresi*; 97-100.
- Anonimb. (2008). Use of rosemary extracts as a food additive. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.721> (Erişim tarihi:07.07.2024).
- Anonima. (2016). Antosiyaninler ve Antosiyanidinler www.food-info.net/tr/colour/anthocyanin.htm. Erişim Tarihi: 18.05.2024.
- Aron PM. & Kennedy JA. (2008). Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity. *Mol Nutr Food Res.* 52(1):79-104.
- Arumugam, M. K., Paal, M. C., Donohue Jr, T. M., Ganesan, M., Osna, N. A. & Kharbanda, K. K. (2021). Beneficial effects of betaine: a comprehensive review. *Biology*, 10(6), 456. <https://doi.org/10.3390/biology10060456>
- Ashktorab, H., Soleimani, A., Singh, G., Amin, A., Tabatabaei, S., Latella, G., ... & Brim, H. (2019). Saffron: the golden spice with therapeutic properties on digestive diseases. *Nutrients*, 11(5), 943. <https://doi.org/10.3390/nu11050943>
- Aytar, M., Boncooğlu, R. Y., Erdoğan, Ö., Başbülbul, G. & Öztürk, B. (2024). Antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, wound healing potentials and LC-MS/MS analysis of water extract of *Rhus coriaria* L.(sumak) leaves. *Food Bioscience*, 60, 104400. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104400>
- Ayyıldız, S. & Sarper, F. (2019). Antioksidan baharatların Osmanlı saray mutfağındaki yeri. *Karabük Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 9 (1), 363-390.
- Balasubramanian, S., Roselin, P., Singh, K. K., Zachariah, J. & Saxena, S. N. (2016). Postharvest processing and benefits of black pepper, coriander, cinnamon, fenugreek, and turmeric spices. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(10), 1585-1607. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.759901>
- Barzkar, N., Ivanova, S., Sukhikh, S., Malkov, D., Noskova, S., Babich, O. (2024). Phenolic compounds of brown algae. *Food Bioscience*, 105374. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105374>
- Bathe, U. & Tissier, A. (2019). Cytochrome P450 enzymes: a driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry*, 161, 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.003>
- Beckerman, B., & Persaud, H. (2019). Nutmeg overdose: spice not so nice. *Complementary therapies in medicine*, 46, 44-46. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.07.0111>

- Beltrán, J., & Wurtzel, E. T. (2024). Carotenoids: resources, knowledge, and emerging tools to advance apocarotenoid research. *Plant Science*, 112298. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112298>
- Bhusal, D., & Thakur, D. P. (2021). Curry Leaf: A Review. *Reviews in Food and Agriculture*, 2(1), 36-38. <http://doi.org/10.26480/rfna.01.2021.36.38>
- Bielecka-Dabrowa, A., Banach, M., Wittczak, A., Cicero, A. F., Kallel, A., Kubilius, R., ... & Von Haehling, S. (2023). The role of nutraceuticals in heart failure muscle wasting as a result of inflammatory activity. The International Lipid Expert Panel (ILEP) Position Paper. *Archives of Medical Science: AMS*, 19(4), 841. <https://doi.org/10.5114/aoms/167799>
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M. & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Sci.*, (5): 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.005>
- Buran, A., Topdemir, A. & Öztürk, R. (2022). Üzüm Çekirdeği, Çörek Otu ve Keten Tohumu Tozlarının Antioksidan, Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarları. 1st International Conference on Innovative Academic Studies, September 10 - 13, 2022, Konya, Turkey.
- Carneiro, A., Matos, M. J., Uriarte, E., & Santana, L. (2021). Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020. *Molecules*, 26(2), 501. <https://doi.org/10.3390/molecules26020501>
- Ceyhun Sezgin, A., & Karaman, E. (2021). Türk Mutfak Kültüründe Çorbalaradaki Umami Bileşikler. *Çatalhöyük Uluslararası Turizm ve Sosyal Araştırmalar Dergisi*, (7), 1-15.
- Cong-Cong, X.U., Bing, W.A.N.G., Yi-Qiong, P.U., Jian-Sheng, T.A.O. & Zhang T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese journal of natural medicines*, 15 (10): 721-71. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)
- Demir, Ö. (2020). Türk Mutfağında Yer Alan Şerbetli Tatlılar, (Ed.Şahin Perçin, N., Uçuk, C.) Uygulamalı Türk Mutfağı, Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Doğan, M., & Özdemir, K. (2022). Investigation of the Effect of Spice on Gastronomy History and Culture. *İzlek Akademik Dergi*, 5(2), 27-41.
- Dosoky, N. S., Satyal, P., Barata, L. M., da Silva, J. K. R., & Setzer, W. N. (2019). Volatiles of black pepper fruits (*Piper nigrum* L.). *Molecules*, 24(23), 4244.
- Durlu-Özkaya, F. & Cömert, M., (2017), Türk Mutfağında Yolculuk, Detay Yayıncılık, Ankara.
- Faten, Y.I. & El-Shehawy, M. (2013). The antimicrobial and antioxidant effects of aqueous thyme and sumac extracts in refrigerated minced beef meat. *J Product & Dev*, 18(1), 23-35. <https://doi.org/10.21608/jpd.2013.42478>
- Gaddekar, Y.P., Thomas R., Anjaneyulu A.S.R., Shinde A.T. & Pragati H. (2006). Spices and their role in meat products: a review. *Beverage and Food World*, 33(7), 57-60.
- Girgin, G. K., Demir, Ö. & Çetinkaya, V. (2017). Dünyanın en iyi mutfakları ve Türk mutfağı. *Journal of Tourism & Gastronomy Studies*, 5(Special Issue 2), 219-229.
- Gül, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B. & Wani, A. A. (2015). Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene-A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1018696. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1018696>
- Güldemir, O. & Işık, N. (2012). Tatlılara tat katan kabuk: tarçın (osmanlı mutfağındaki yeri). 1. Türk Mutfak Kültürü Sempozyumu (Osmanlı Mutfak Kültürü) (14-15 Ekim 2010), Bilecik: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Yayınları, 311-334.
- Güney, S. (2023). Foods spreading from Turkish cuisine to the world. *Journal of multidisciplinary academic tourism*, 8(2), 159-169. <https://doi.org/10.31822/jomat.2023-8-2-159>
- Gürsoy, D. (2012). Baharat ve Güç. Oğlak Yayıncılık.
- Haksel, M. (2007). https://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodyayinlari/ila_habr-kas07/7.pdf (Erişim tarihi: 07.07.2024).
- Hammoudi Halat, D., Soltani, A., Dalli, R., Alsarraj, L., & Malki, A. (2023). Understanding and fostering mental health and well-being among university faculty: A narrative review. *Journal of clinical medicine*, 12(13), 4425. <https://doi.org/10.3390/jcm12134425>
- Harşit, B. (2015). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde halk arasında tıbbi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi [Yüksek lisans tezi Artvin Çoruh Üniversitesi]. DSpace@Artvin <https://hdl.handle.net/11494/1214>
- Hasko, L. (2023). Başlıca baharatların kimyasal bileşimi ve fonksiyonel özellikleri. [Yüksek lisans tezi Topkapı Üniversitesi]. DSpace@Topkapı.
- Hill, T. (2019). Kokulu Ot ve Baharat Ansiklopedisi. (Çev: Nazlı Pişkin), Oğlak Yayınevi: İstanbul.
- Himmelfarb, J., Kane, J., Mcmonagle, E., Zaltas, E., Bobzin, S., Boddupalli, S. & Miller, G. (2003). Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease. *Kidney international*, 64(3), 978-991. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00151.x>
- Hussain, M. K., Khatoon, S., Khan, M. F., Akhtar, M. S., Ahamad, S., & Saquib, M. (2024). Coumarins as versatile therapeutic phytochemicals: A systematic review. *Phytomedicine*, 134, 155972. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155972>
- Jikah, A. N., & Edo, G. I. (2024). Turmeric (*Curcuma longa*): an insight into its food applications, phytochemistry and pharmacological properties. *Vegetos*, 1-22. <https://doi.org/10.1007/s42535-024-01038-4>
- Kabak, B. & Dobson, A. D. (2017). Mycotoxins in spices and herbs—An update. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 57(1), 18-34. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772891>
- Kavrut, E. İçdir Halk Mutfak Kültüründe Yer Alan Lezzetlerin Değerlendirilmesi. *Gastro-World*, 1(2), 1-14.
- Khairullah, A. R., Solikhah, T. I., Ansori, A. N. M., Fadholly, A., Ramandinianto, S. C., Ansharieta, R., & Anshori, A. (2020). A review of an important medicinal plant: *Alpinia galanga* (L.) willd. *Syst Rev Pharm*, 11(10), 387-395.
- Kılıçhan, R. & Çalhan, H. (2015). Mutfakların Sihri Baharat: Kayseri İlinde BaharatTüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesine Yönelik Bir Çalışma. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 3(2), 40-4.
- Küçük Kurt, İ. & Fidan, A. F. (2008). Saponinler ve bazı biyolojik etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 1(1), 89-96.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacog Rev* 4(1): 18-26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E. & López-Malo, A. (2019). Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in in-vitro and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts. *International journal of food microbiology*, 295: 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.008>
- Mahendran, G., & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha× piperita* L.)—A review. *Phytotherapy Research*, 34(9), 2088-2139. <https://doi.org/10.1002/ptr.6664>
- Manandhar, N. (2018). Phytochemical and antioxidant activity of common spices and their mix (Doctoral dissertation).

- Mendonça, C. R., Manhães-de-Castro, R., de Santana, B. J. R. C., da Silva, L. O., Toscano, A. E., Guzmán-Quevedo, O., & Galindo, L. C. M. (2022). Effects of flavonols on emotional behavior and compounds of the serotonergic system: A preclinical systematic review. *European Journal of Pharmacology*, 916, 174697. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174697>
- Mete, O. (2017). *Baharatlar Soframızın Lezzeti, Ağzımızın Tadı*, Alfa Yayıncılık, İstanbul.
- Mohammed, F. S., Sevindik, M., Uysal, İ., Česko, C., & Koraqi, H. (2024). Chemical Composition, Biological Activities, Uses, Nutritional and Mineral Contents of Cumin (*Cuminum cyminum*). *Measurement: Food*, 100157. <https://doi.org/10.1016/j.meaf.2024.100157>.
- Nam, Y. J., Lee, Da H., Shin, Y. K., Sohn, D. S. & Lee, C. S. (2015). Flavanol Taxifolin Attenuates Proteasome Inhibition-Induced Apoptosis in Differentiated PC12 Cells by Suppressing Cell Death Process. *Neurochem Res.*, 40(3):480-91. <https://doi.org/10.1007/S11064-014-1493-X>
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5(3), 98.
- Opara, E. I. & Chohan, M. (2021). *Culinary Herbs and Spices: A Global Guide*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781839164446>
- Özilgen, S. & Samancı, Ö. (2020). *Hikâyeleriyle Türk mutfağı*. Yeditepe Üniversitesi Yayınevi.
- Pilla, N., Gabrielli, P., Aguzzi, A., Lucarini, M., & Durazzo, A. (2024). Allspice (*Pimenta dioica*). In *Medicinal Spice and Condiment Crops* (pp. 123-130). CRC Press.
- Pravst, I. (2012). Functional foods in Europe: A focus on health claims. In B. Valdez, M. Schorr & R. Zlatez (Eds), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*, (pp.165-208). InTech.
- Rafieian, F., Amani, R., Rezaei, A., Karaça, A. C., & Jafari, S. M. (2024). Exploring fennel (*Foeniculum vulgare*): Composition, functional properties, potential health benefits, and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(20), 6924-6941. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2176817>
- Ribeiro, M. M., Viganó, J., Meireles, M. A. A., & Veggi, P. C. (2022). Recent advances in the recovery of tannins from natural matter. *Studies in Natural Products Chemistry*, 75, 289-328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91250-1.00008-2>
- Romeo, F. V., Ballistreri, G., Fabroni, S., Pangallo, S., Li Destri Nicosia, M. G., Schena, L. & Rapisarda, P. (2015). Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. *Molecules*, 20(7), 11941-11958. <https://doi.org/10.3390/molecules200711941>
- Sabbağ, Ç. & Boğan, E. (2019). *Türk mutfağının gelişim sürecine genel bakış*. (edt. Sarıışık, M. ve Özbay, G.), Ulusal gastronomi ve Türk mutfağı (tarihçe, hammadde, ritüeller, özgün yemekler ve reçeteler) Detay Yayıncılık, Ankara.
- Saki, A.A., Kalantar, M. & Khoramabadi, V. (2014). Effects of drinking Thyme essence (*Thymus vulgaris* L.) on growth performance, immune response and intestinal selected bacterial population in broiler chick- ens. *Poultry Science Journal*, 2(2):113–123.
- Sayılı, M., Şekeroğlu, N., Akça, H. & Yaramancı, H. (2006). Ordu ili kentsel alanda tüketicilerin baharat tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 1-7.
- Spence, C. (2023). Cinnamon: The historic spice, medicinal uses, and flavour chemistry. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 100858. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100858>
- Srividya, A. R., Nagasamy, V. & Vishnuvarthan, V. J. (2010). Nutraceutical as medicine: a review. *Pharmanest* 1(2):132–145.
- Sun, W., Shahrajabian, M. H. & Cheng, Q. (2019). Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biology*, 5(1), 1673688. <https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1673688>
- Tai, J., Cheung, S., Wu, M. & Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cell in vitro. *Phytomedicine*, 19:436- 443. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.012>
- Tang, X., Xu, C., Yagiz, Y., Simonne, A. & Marshall, M. R. (2018). Phytochemical profiles, and antimicrobial and antioxidant activities of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.] flowers. *Food chemistry*, 255, 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.027>
- Tatipamula, V. B. & Kukavica, B. (2021). Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell biochemistry and function*, 39(8), 926-944. <https://doi.org/10.1002/cbf.3667>
- Tucker, J. M. & Townsend, D. M. (2005). Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 59(7), 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.06.005>
- Velasco-Negueruela A. (2001). *Handbook of herbs and spices*, Peter, K.V. (Ed.), İkinci Baskı, Woodhead Publishing In Food Science And Technology içinden (s.76-286), New York Washington DC.
- Vignesh, A., Amal, T. C., Sarvalingam, A., & Vasanth, K. (2024). A Review on the Influence of Nutraceuticals and Functional Foods on Health. *Food Chemistry Advances*, 100749. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100749>
- Wang, J., Tang, X., Liu, F., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J., ... & Cui, S. (2024). Sources, metabolism, health benefits and future development of saponins from plants. *Food Research International*, 115226. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115226>
- Yağın, A. (2000). *Baharat grupları*, İstanbul, Geçit Kitabevi.
- Yerasimos, M. (2014). *500 yıllık Osmanlı Mutfağı*, İstanbul: Boyut Yayıncılık.
- Yıldırım, K. (2019). *Fenolik Bileşikler*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Yıldız, G. & Yıldız, G. (2022). *Antioksidanlar ve Fenolik Maddeler*. İKSAD Yayınevi, Ankara.
- Yıldız, S., & Midilli, A. (2023). Sebzelelerin Baharat Olarak Kullanım Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 5(2), 272-288.
- Yiğit, A. (2016). *Baharatlar*. Aktaş, S.G. (Editör), Gıda Coğrafyası içinden, Birinci Baskı, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları, 216-245.
- Yiğit, S. & Samav, U. (2020). *Türk Mutfağında Yer Alan Sebze Yemekleri, Uygulamalı Türk Mutfağı* (edt. Şahin Perçim, N. ve Uçuk, C.), Nobel Yayınları, Ankara.
- Zhang, M., Zhao, R., Wang, D., Wang, L., Zhang, Q., Wei, S. & Wu, C. (2021). Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. *Phytotherapy Research*, 35(2), 711-742. <https://doi.org/10.1002/ptr.6858>
- Zia-Ul-Haq, M. (2021). Historical and introductory aspects of carotenoids. *Carotenoids: structure and function in the human body*, 1-42. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_1
- Ziaei, R., Shahdadian, F., Bagherniya, M., Karav, S., & Sahebkar, A. (2024). Nutritional factors and physical frailty: Highlighting the role of functional nutrients in the prevention and treatment. *Ageing Research Reviews*, 102532. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102532>



The Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on AFM1 Detoxification in Ice Cream

Tuğba Demir^{1,a,*}, Soner Tutun^{1,b}

¹Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary, Food Hygiene and Technology, Sivas, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 10.10.2024

Accepted : 05.12.2024

Keywords:

AFM1

Lactobacillus rhamnosus

Detoxification

Mycotoxin

Food Safety

ABSTRACT

This study investigates the effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* in the detoxification of AFM1 contamination. Experiments conducted on two groups of ice cream samples measured an average AFM1 level of 0.0308 µg/kg in the control group and 0.0258 µg/kg in the group with *L. rhamnosus* added. The results indicate that *L. rhamnosus* significantly reduced AFM1 levels (46%) and was thus effective in the detoxification of AFM1. Our statistical results were found to be significant ($p < 0.05$). These findings highlight the potential of *L. rhamnosus* to reduce AFM1 contamination in ice cream products, making a significant contribution to food safety. Controlling mycotoxins in food products is critical for protecting consumer health and enhancing food safety.

^a tugba@cumhuriyet.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-5195-9372>

^b sonertutun@cumhuriyet.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-6208-476X>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Ice cream is generally defined as “a dairy product obtained by processing a mixture of milk and dairy products (such as milk powder, cream), sweeteners, stabilizers, emulsifying agents, color and flavoring substances by adding air to them in freezers” (Türkmen and Gürsoy, 2017). Ice cream is a common consumer product, in addition to containing many bioavailable substances for the human body. It is known that its consumption is limited for some consumer groups (e.g. people with lactose intolerance and milk allergy) (Góral et al., 2018). It has been reported that the number of people with milk allergy and lactose intolerance is almost 80% of the world population (Pineli et al., 2015). At this point, beverages obtained from plant sources as an alternative to cow’s milk and products produced using these beverages increase the variety of alternative products for consumer groups who have difficulty in daily nutrition (Góral et al., 2018).

Mycotoxins are secondary metabolic products produced by toxigenic molds and cause a disease called mycotoxicosis in humans and animals. (Miller, 2016). Mycotoxins are small molecular structures, usually aromatic compounds. Molds of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* are among the most important species that synthesize mycotoxins and they are all from the hypomycetes class. Hundreds of mycotoxins

have been identified today, but the most important in terms of their formation and toxicity are aflatoxins, fumonisins, trichothecenes, ochratoxins, patulin and zearalenone and their metabolites. There are many other toxicologically important but less studied mycotoxins such as ergot alkaloids, enniatins, alternaria toxins, moniliformin, citrinin, beauvericin, cyclopiasonic acid, roquefortine C, mycophenolic acid, penitrems (Kralj and Prosen, 2009). To date, approximately 400 different mycotoxins have been identified (Kowalska et al., 2017). Aflatoxins, Ochratoxin A, Patulin, Sterigmatocystin, Ergot alkaloids, Trichothecenes, Zearelenone, Citrinin, Penicillium, Fumonisin and Rubratoxin are among the mycotoxins of particular importance. Aflatoxins are the most studied group of mycotoxins due to their potential carcinogenic effects (Kowalska et al., 2017). Mycotoxins are also defined according to their effects on different tissues and organs or their mechanisms of action. Those that affect the liver are defined as “hepatotoxic”, those that affect the nervous system are defined as “neurotoxic”, those that affect the kidneys are defined as “nephrotoxic”, those that affect the immune system are defined as “immunotoxic” and those that affect the embryo are defined as “embryotoxic” (Adhikari et al., 2017).

Aflatoxins are toxic secondary metabolites produced by certain types of molds (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*) such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus paraciticus*. Consumption of food or feed contaminated with aflatoxins can cause a disease called “aflatoxicosis” in humans and animals. An incident in England (1960) that resulted in the death of more than 100.000 turkeys caused aflatoxins to draw attention for the first time (Ağaoğlu et al., 2020). This disease, which also affected ducklings, was called “Unknown Turkey Disease” (Turkey-X-Disease) (Kowalska et al., 2017). Research has demonstrated that turkey feed containing moldy peanut meal imported from Brazil was contaminated with *Aspergillus flavus*. Consumption of these moldy feeds was determined to be the cause of poisoning cases seen in turkeys and ducks. The word aflatoxin originates from the letters “A” and “fla” of *Aspergillus flavus* and the suffix “toxin” (A-fla-toxin), which means poison (Kowalska et al., 2017, Ağaoğlu et al., 2020). Aflatoxins are compounds that have toxic effects on human and animal health. Depending on the amount of toxin ingested and the duration of the toxin’s effect, acute and chronic poisoning can occur in humans and animals. In humans, vomiting, abdominal pain, jaundice, pulmonary edema, coma and convulsions are the most common symptoms of aflatoxin poisoning (Li et al., 2018). In chronic aflatoxicosis, immune suppression and liver damage occur. In addition to the carcinogenic, mutagenic, teratogenic, hepatotoxic and immunosuppressive properties of aflatoxins, they have also been reported to be effective in kidney damage and the formation of various organ tumors (lung, liver, breast, colon, rectum) (Li et al., 2018).

Mycotoxins are highly toxic substances produced by fungi that pose a serious threat to both human and animal health. Mycotoxin contamination in food and feed is a global problem that causes major economic losses every year (Biniş and Demir, 2023). As a result of years of research, various methods have been developed to render mycotoxins harmless, and among them, biological methods stand out with their great potential and advantages (Liu et al., 2022, Taşcı et al., 2022). Scientists are increasingly choosing biological transformation methods that aim to detoxify mycotoxins by breaking them down into less toxic compounds or enzymatically converting them. It has been shown that many microorganisms such as bacteria, molds and yeasts can biologically convert these toxins (Hathout and Aly, 2014). In recent years, biological detoxification approaches, especially those using microbial cells or enzymes, have proven to be highly effective in degrading mycotoxins to less harmful products with high specificity (Afsah-Hejri et al., 2020). Studies conducted on milk and dairy products have validated the success of probiotic-based detoxification to prevent aflatoxin contamination (Khamesipour et al., 2013, Godoy et al., 2024). Compared to physical and chemical methods, biological detoxification processes can be carried out with less loss of nutritional value of foods and under milder conditions (Zhu et al., 2017). Recently, there has been an increasing interest in the application of probiotics with high xenobiotic binding capacity, which can be used to protect against food contaminants, for example, to alleviate the acute and chronic toxicity of aflatoxins via *Lactobacillus* strains (Reddivari et al., 2017, Demir and Ağaoğlu, 2023).

In vitro and in vivo experiments have shown that probiotic microorganisms can bind and/or metabolize various chemical contaminants such as organophosphorus pesticides, mycotoxins, and heavy metals (Feng et al., 2018, Godoy et al., 2024). Probiotics can directly bind certain xenobiotics to the cell wall, thereby reducing their bioactivity and toxicity (Alizadeh et al., 2022). Probiotic strains with xenobiotic binding capacity have been reported to be a simple and effective way to reduce the amount of contaminants absorbed from food in chemically contaminated areas worldwide (Biniş and Demir, 2023).

The aim of this study is to evaluate the potential of *Lactobacillus rhamnosus* to reduce Aflatoxin M1 (AFM1) levels in ice cream samples. Additionally, the study seeks to investigate the interaction mechanisms of this probiotic bacterium with AFM1, highlighting its potential as an effective biological solution for food safety.

Materials and Methods

Material

In the study, a total of 30 packaged ice cream samples in plain, chocolate and fruit varieties obtained from ice cream selling companies and local businesses in Sivas province were analyzed. These samples, taken under aseptic conditions and at different times, were brought to the laboratory of the Food Hygiene and Technology Department of the Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University for analysis by applying a cold chain. The samples were stored in the freezer at -18°C until the analysis was completed.

Method

AFM1 levels in ice cream samples were determined using ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method. Shanghai Coon Koon Biotech Co CK-LAB KIT, CK-bio-20774 was used in the analyses. All analysis steps were carried out in accordance with the recommendations of the manufacturer. Additionally, the VITA-PRONIT probiotic microorganism commercial supplement (*Lactobacillus rhamnosus* 1.75 x 10⁹ cfu/ml) was used for the detoxification of ice cream.

Kit Contents

Biotech Co CK-LAB KIT, CK-bio-20774 used in the analyses contains; 12x8 well strips (in foil), 6 standards (0, 5, 10, 25, 50 and 100 ppt), 15 ml AFM1 conjugate solution, 15 ml substrate solution, 15 ml stop solution and 15 ml wash solution (x20 concentrate). The detection limit of this kit is 5 ppt.

ELISA Kit Analysis Procedure

Samples and Aflatoxin M1 standards were added to antibody-coated microwells and AFM1 was allowed to bind to the antibody binding sites. Following a wash step, enzyme-bound aflatoxin was added, allowing antibodies to bind to the free binding sites. After a second wash step, enzyme substrate was added and the color change was observed. The color intensity is inversely proportional to the AFM1 concentration in the sample or standard. A stop solution was then added, changing the color from blue to yellow, and the absorbance of each well was measured at 450 nm and 630 nm. The measurement was completed within 10 min after the stop solution was added.

Preparation of Samples

Pretreatment of Ice Cream Samples

5 mL of the ice cream sample was left at room temperature and pipetted into a test tube and incubated at 4°C for 30 min. Then, the sample was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The oil layer formed after centrifugation was carefully removed with a Pasteur pipette and 100 µL of milk serum sample was separated from the layer below. After these procedures were completed, the samples were ready for analysis.

Test Protocol

Each standard (0, 5, 10, 25, 50 and 100 ppt) and 100 µL of samples were added to the antibody-coated wells using different pipette tips. The wells were incubated at room temperature for 45 min. After the incubation period, the microwell content was emptied into the waste container, and each microwell was filled with washing solution and emptied, washing a total of five times. Then, 100 µL of conjugate solution was added to each antibody-coated microwell, and the wells were incubated for another 15 min at room temperature. After incubation, the washing process was repeated as in the previous step. 100 µL of substrate solution was added to each microwell and incubated for 15 min at room temperature. Then, 100 µL of stop solution was added to each well, and a color change from blue to yellow was observed. Finally, the absorbance of each well was measured at 450 nm (reference wavelength 630 nm) with a microwell reader within 10 min.

Statistical Analysis

The descriptive statistics of AFM1 levels detected in the samples were analyzed, and the relationships between these values were evaluated using a paired samples t-test in SPSS version 23.00.

Results and Discussion

This study investigated the effect of *L. rhamnosus* on AFM1 levels in ice cream samples. The data obtained show variations in AFM1 levels across a total of 30 ice cream samples (Figure 1). The highest AFM1 level, measured before the addition of probiotics, was observed in sample 24 at 0.0467 µg/kg. This represents the highest level of AFM1 contamination in the ice cream. The lowest AFM1 level was detected in sample 19 after the addition of probiotics, measuring 0.0163 µg/kg. This indicates that probiotics significantly reduce AFM1 levels.

The average AFM1 levels were calculated as 0.0308 µg/kg before the addition of probiotics and 0.0258 µg/kg after the addition. This shows that *L. rhamnosus* reduced AFM1 levels by an average of 24.5%. The percentage reduction values observed among the ice cream samples exhibit significant differences. The highest percentage reduction was determined in sample 17 at 46.10%, reflecting the most effective condition for probiotic addition. Other notable reduction values were recorded in sample 16 at 40.05%, sample 18 at 34.60%, and sample 14 at 27.41%.

However, some samples showed low percentage reductions despite the addition of probiotics, with sample 1 and sample 8 exhibiting reductions of only 2.60% and 3.30%, respectively. This suggests that the probiotic's efficacy (binding capacity) may not have been sufficient at the concentration added. In conclusion, this study demonstrates that *L. rhamnosus* has the potential to significantly reduce AFM1 levels in ice cream samples. The findings highlight the importance of probiotic applications in terms of food safety and indicate a need for further research.

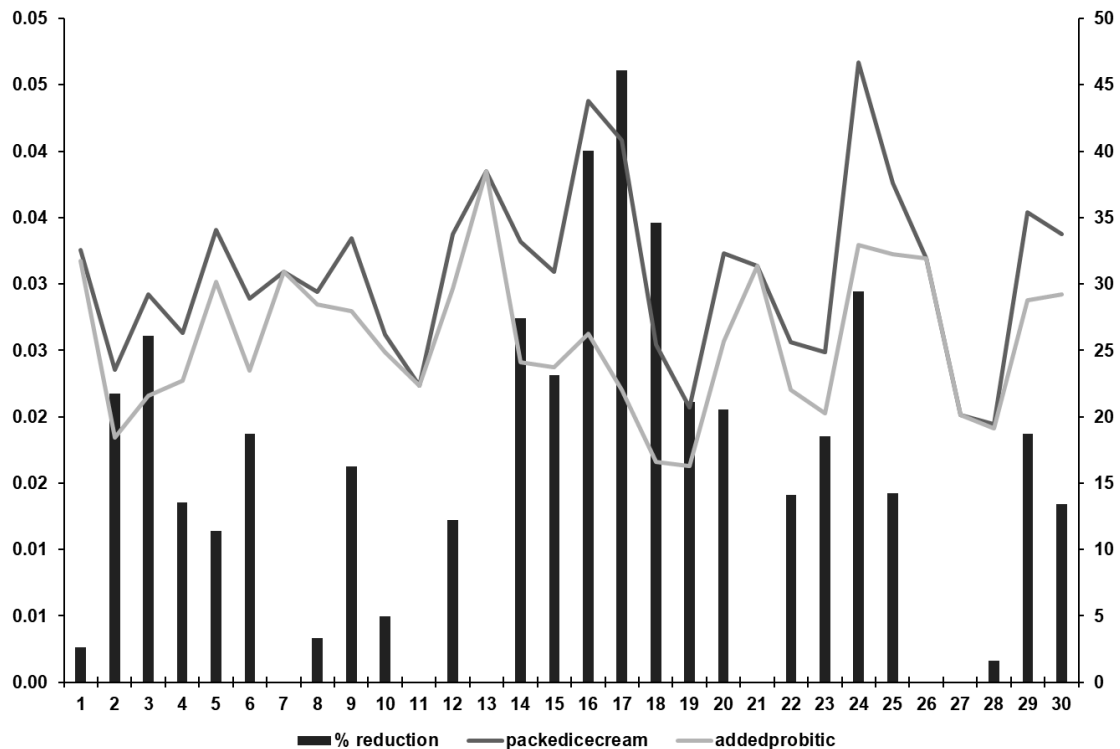


Figure 1. Comparison of AFM1 levels and % reduction in packed ice cream and ice cream with added *L. rhamnosus*.

In this study, AFM1 levels were measured before and after the addition of *L. rhamnosus* in 30 ice cream samples, and the difference between these two conditions was statistically analyzed. According to the Paired Samples Statistics table, the average AFM1 level before the addition of *L. rhamnosus* was 0.03076, while the average after addition was found to be 0.02579. This indicates that *L. rhamnosus* reduced the AFM1 level by an average of 0.004973 units. Additionally, the correlation coefficient between the measurements was 0.694, which is statistically significant ($p = 0.001$). According to the results of the Paired Samples Test, the average difference related to the reduction of AFM1 levels by *L. rhamnosus* is 0.004973, with a standard deviation of 0.004902. The obtained t-value is 5.557 and the p-value is 0.001. The p-value being less than 0.05 indicates that this reduction in AFM1 levels is statistically significant. Furthermore, based on the 95% confidence interval, it was observed that this difference ranges from 0.003143 to 0.006804. These results

demonstrate that *L. rhamnosus* significantly reduces AFM1 levels, and this finding is statistically reliable (Table 1).

Figure 2 shows that the scatterplot matrix consists of four panels illustrating the relationships between the variables “packedicecream” (packed ice cream) and “addedprobiotic” (probiotic added). The positive trend observed in the graph indicates a strong correlation between the two groups, with AFM1 levels being relatively close to each other. However, there is an overall decrease in AFM1 levels following the addition of probiotics, reflecting the differences between the two groups. Both the correlation analysis and the results of the preceding t-test support the conclusion that the addition of probiotics significantly reduces AFM1 levels.

Aflatoxins are toxic metabolites that pose a significant threat to food safety. Liu et al. (2020) emphasized in their study that the biological decontamination of aflatoxins is particularly achieved through the use of lactic acid bacteria (LAB).

Table 1. Statistical Analyses

Paired Samples Statistics							
Pair	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Packed Ice Cream	0.03076	30	0.006717	0.001226			
Added Probiotic	0.02579	30	0.005483	0.001001			
Paired Samples Test							
Pair	Mean Difference	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower: Upper:	t	df	Sig. (2-tailed)
Packed Ice Cream - Added Probiotic	0.004973	0.004902	0.000895	0.003143, 0.006804	5.557	29	0.001

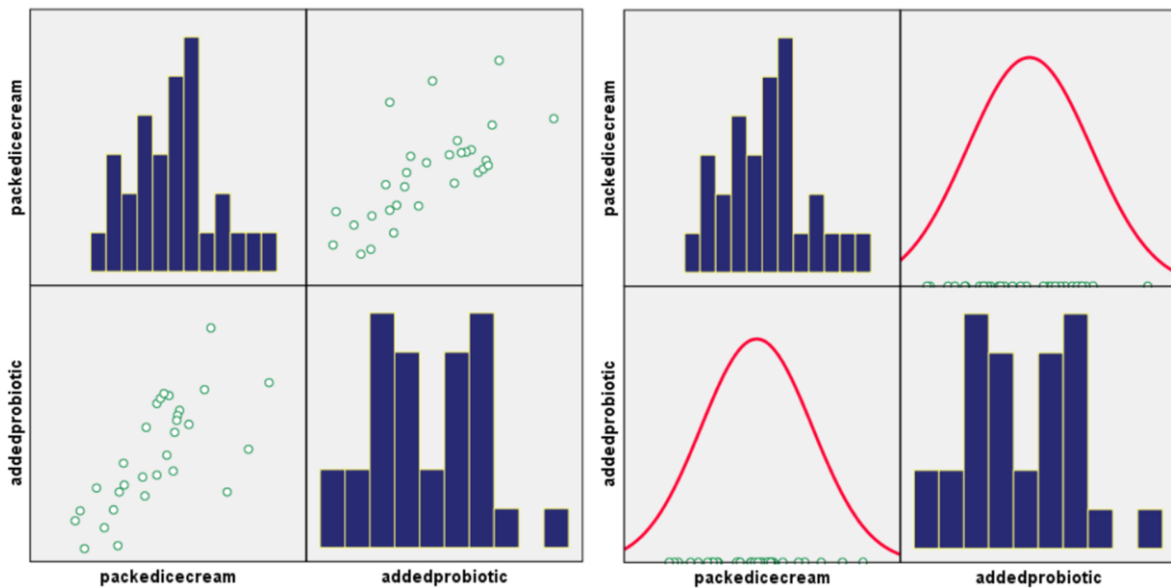


Figure 2. Scatterplot matrix comparing AFM1 levels in packed ice cream and ice cream with added *L. rhamnosus*

In this study, the binding mechanisms of LAB with aflatoxins were examined in detail, highlighting the potential of these bacteria for the decontamination of harmful substances in food and agriculture. When

compared to the data obtained in this study, it suggests that lactic acid bacteria may play an important role in the effective reduction of aflatoxins. In this study, the results obtained from measuring AFM1 levels in 30 ice cream

samples demonstrate how the addition of LAB affects aflatoxin levels. For example, the highest reduction of 46.10% supports the interaction of LAB with aflatoxins and how this interaction binds aflatoxins. This finding is consistent with the results from Liu et al. (2020), which also emphasized the importance of LAB's capacity to bind aflatoxins.

Moreover, the highest reduction rate of 46.10% noted in this study clearly demonstrates the effectiveness of LAB in aflatoxin decontamination. Liu et al. (2020) stated that LAB can bind aflatoxins, thereby removing them from food systems. This situation aligns with the highest reduction of 46.10% observed in this study, indicating that the use of LAB can effectively reduce aflatoxins to safe levels. Consequently, the data obtained suggest that lactic acid bacteria could be an effective strategy for reducing aflatoxin contamination in food products. The information presented in Liu et al. (2020) and similar studies further strengthens the potential of these microorganisms in food safety applications. Future studies could contribute to the knowledge base in this field by examining the interaction mechanisms of LAB with aflatoxins in greater detail (Liu et al., 2020).

In the study conducted by Rezasoltani et al. (2021), the detoxification effects of the probiotics *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus* on AFM1 in reconstituted milk were investigated. The research results indicated that the highest AFM1 removal rate was achieved with a concentration of *S. boulardii* at 10^9 cfu/ml for 90 minutes at 37°C with a toxin concentration of 0.75 ng/ml, yielding a cleaning rate of 96.88 ± 3.79 . Additionally, a significant cleaning rate of 71.46 ± 3.79 was found with *L. acidophilus* at a concentration of 10^7 cfu/ml for 90 minutes at 4°C with the same toxin concentration. Similarly, the binding percentage achieved with *L. casei* at a concentration of 10^7 cfu/ml was determined to be 64.31 ± 3.79 . These findings support the notion that probiotics can be an effective strategy for the detoxification of harmful compounds like AFM1. When compared to the data in our study, similar results were obtained using *L. rhamnosus* in samples with the highest aflatoxin reduction. This suggests that probiotics offer a potential solution for food safety (Rezasoltani et al., 2021).

In the study conducted by Abbès et al. (2013), the in vitro binding capacity of *L. rhamnosus* GAF01 to AFM1 and its protective role against the immunotoxic effects of AFM1 were examined. The study found that *L. rhamnosus* GAF01 exhibited a binding ability of AFM1 ranging from 15.3% to 95.1% in reconstituted milk samples containing 0.05, 0.10, and 0.20 µg AFM1/ml, with this binding occurring as a stable complex formation between the bacteria and AFM1. Additionally, it was noted that *L. rhamnosus* GAF01 provided a protective effect on the total white and red blood cells and lymphocyte subtypes by preventing the adverse effects of AFM1 on the immune system after a 15-day treatment. These findings indicate that probiotics could play a significant role in food safety and may be effective in the detoxification of AFM1. When compared with in this study on the interaction of *L. rhamnosus* GAF01 with AFM1 reveal that this probiotic strain holds substantial potential for the detoxification of harmful compounds. For instance, our experiments

similarly found a high binding capacity of *L. rhamnosus* to AFM1, highlighting its potential to reduce aflatoxin levels in food products. These studies support the notion that probiotics could be a reliable and effective method for the detoxification of AFM1 in food products (Abbès et al., 2013).

Zhang et al. (2019) investigated the binding capacity of *L. rhamnosus* LC-4 to AFM1. The study demonstrated that this probiotic strain could effectively bind AFM1 and exhibited high binding efficiency even in acidic environments. The critical role of peptidoglycans in the AFM1 binding process underscores the potential of LAB in food safety. The detoxification ability of *L. rhamnosus* in yogurt suggests that the use of such bacteria as food additives could be an important strategy (Zhang et al., 2019).

Salem-Bekhit et al. (2023) evaluated the detoxification of AFM1 in milk using *L. rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, optimal conditions were determined using a Box-Behnken design, achieving a remarkable 98.4% detoxification of AFM1. This impressive result highlights the impact of probiotics on milk contamination (Salem-Bekhit et al., 2023). On the other hand, Elsanhoty et al. (2014) investigated the removal of AFM1 in yogurt production using various LAB and bifidobacterial strains. The results indicated that *Lactobacillus plantarum* was the most effective strain, binding AFM1 at the highest rate and reducing AFM1 levels throughout the storage period of the yogurts. These findings support the significant role of probiotics in the detoxification of AFM1 in food products (Elsanhoty et al., 2014). While these two studies highlight the effectiveness of *Lactobacillus* species in reducing AFM1, our hypothesis to lower AFM1 levels using *L. rhamnosus* in our study are aligned with these findings. The potential of probiotics to ensure food safety and reduce the bioavailability of toxins underscores the importance of such applications in industrial settings when combined with your research on dairy products.

Kuharić et al. (2019) explored the use of local LAB in milk and dairy products to reduce AFM1 levels. In this study, ten local LAB species were isolated, and their binding efficacy to AFM1 was evaluated. The binding efficiency varied between 21% and 94% after incubating viable and heat-treated LAB cells in AFM1-enriched milk samples for 0, 2, 4, and 24 hours. *L. plantarum* KM, which exhibited the highest binding activity, was used for the removal of AFM1 from milk. A combination of heating, filtration, and centrifugation achieved up to 96% removal of AFM1 (Kuharić et al., 2019).

Assaf et al. (2019) examined the use of microbial-derived adsorbents to reduce AFM1 contamination in milk. Different strategies were evaluated regarding the binding stability of AFM1 and the efficacy of microbial adsorbents. The abilities of biological adsorbents, such as bacteria and yeast, to bind AFM1 in complex form within milk were emphasized. These findings present promising alternatives for the biological removal of AFM1 (Assaf et al., 2019).

These studies, along with our data on the effectiveness of *L. rhamnosus* in reducing AFM1 levels, suggest that microorganisms play an important role in the removal of aflatoxin, with various LAB species exhibiting different binding efficiencies. In particular, the use of *L. rhamnosus*

consistently demonstrates its capability to effectively reduce AFM1, aligning with results obtained in previous studies. This study evaluated the effectiveness of *L. rhamnosus* in reducing AFM1 levels. Previous research has shown that local LAB have a significantly high binding capacity for AFM1 (Kuharić et al., 2019; Assaf et al., 2019). In particular, the interaction of *L. plantarum* KM with AFM1 has demonstrated up to 96% removal efficiency. These results suggest that *L. rhamnosus* could be used as an effective biological solution in milk contaminated with AFM1. Furthermore, the potential of combining heating, filtration, and centrifugation in the removal of AFM1 enhances the applicability of these methods. As a result, such biological approaches present promising alternatives for improving the safety of dairy products and reducing consumer exposure to aflatoxins.

Conclusion

Future studies should investigate the effects of different LAB species on AFM1 more comprehensively. In addition, larger-scale and long-term experiments should be conducted to determine the most effective conditions for the removal of AFM1. Moreover, field studies should be conducted to understand how the results obtained in laboratory settings can be translated into practical applications. By doing so, feasible strategies can be developed to reduce AFM1 contamination.

Declarations

We extend our sincere thanks to Sivas Cumhuriyet University Advanced Technology Research and Application Center (CÜTAM) and Dr. Dilara Ülger Özbek for their assistance. Their contributions have significantly contributed to the success of this study.

References

Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Sharafi, H., Jebali, R., Akbari Noghabi, K., & Oueslati, R. (2013). Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM1 in vitro and to counteract AFM1 immunotoxicity in vivo. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 279-286. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.718810>

Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairi, A. A., Kaushik, N. K., & Choi, E. H. (2017). T-2 mycotoxin: Toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20), 33933. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15422>

Afsah-Hejri, L., Hajeb, P., & Ehsani, R. J. (2020). Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1777-1808. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12594>

Ağaoğlu, S., Alemdar, S., & Ercan, N. (2020). Presence of aflatoxin M1 in cube cheeses produced in Sivas region. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(3), 520-525. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i3.520-525.2592>

Alizadeh, A. M., Hosseini, H., Meybodi, N. M., Hashempour-Baltork, F., Alizadeh-Sani, M., Tajdar-Oranj, B., ... & Khaneghah, A. M. (2022). Mitigation of potentially toxic elements in food products by probiotic bacteria: a comprehensive review. *Food Research International*, 152, 110324. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110324>

Assaf, J. C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A., & El Khoury, A. (2019). Assorted methods for decontamination of aflatoxin M1 in milk using microbial adsorbents. *Toxins*, 11(6), 304. <https://doi.org/10.3390/toxins11060304>

Biniş, A. B., & Demir, T. (2023). Açık ve ambalajlı dondurmalarda aflatoksin M1 varlığının araştırılması. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(3), 418-427. <https://doi.org/10.51754/cusbed.1326151>

Demir, T., & Ağaoğlu, S. (2023). Exposure assessment of aflatoxin M1 through ingestion of infant formula in Türkiye. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 11(2), 396-402. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i2.396-402.5805>

Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F., & Badr, F. H. (2014). Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 43, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.002>

Feng, Q., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2018). Gut microbiota: An integral moderator in health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00151>

Góral, M., Kozłowicz, K., Pankiewicz, U., Góral, D., Kluza, F., & Wójtowicz, A. (2018). Impact of stabilizers on the freezing process, and physicochemical and organoleptic properties of coconut milk-based ice cream. *LWT*, 92, 516-522. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.010>

Godoy, A. C., Ziemniczak, H. M., Fantini-Hoag, L., da Silva, W. V., Ferreira, A. C., Saturnino, K. C., ... & Honorato, C. A. (2024). The effects of probiotic-based additives on aflatoxin intoxication in *Piaractus mesopotamicus*: a study of liver histology and metabolic performance. *Veterinary Research Communications*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s1259-024-10409-w>

Hathout, A. S., & Aly, S. E. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of microbiology*, 64, 905-919. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0899-7>

Khamesipour, F., Shahraki, A. K., Moumeni, M., Boroujeni, R. K., & Yadegari, M. (2013). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in the crayfish (*Astacus leptodactylus*) by polymerase chain reaction in Iran. <https://doi.org/10.12692/ijb/3.10.160-169>

Kowalska, A., Walkiewicz, K., Kozieł, P., & Muc-Wierzoń, M. (2017). Aflatoxins: Characteristics and impact on human health. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 71, 315-327. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3816>

Kralj, I., & Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 62-115. <https://doi.org/10.3390/ijms10010062>

Kuharić, Ž., Jakopović, Ž., Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Pavlek, Ž., Ivešić, M., & Markov, K. (2019). Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *AIHT*, 69, 3160. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3160>

Li, S., Min, L., Wang, G., Li, D., Zheng, N., & Wang, J. (2018). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk from manufacturers of infant milk powder in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 879. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050879>

Liu, A., Zheng, Y., Liu, L., Chen, S., He, L., Ao, X., Yang, Y., & Liu, S. (2020). Decontamination of aflatoxins by lactic acid bacteria. *Current Microbiology*, 77, 3821-3830. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02573-5>

Miller, J. D. (2016). Mycotoxins in food and feed: A challenge for the twenty-first century. In *Biology of Microfungi* (pp. 469-493). https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_19

Pineli, L. D. L. D. O., Botelho, R. B., Zandonadi, R. P., Solorzano, J. L., de Oliveira, G. T., Reis, C. E. G., & Teixeira, D. D. S. (2015). Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1261-1267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.094>

- Reddivari, L., Veeramachaneni, D. R., Walters, W. A., Lozupone, C., Palmer, J., Hewage, M. K., & Vanamala, J. (2017). Perinatal bisphenol A exposure induces chronic inflammation in rabbit offspring via modulation of gut bacteria and their metabolites. *mSystems*, 2(6), e00093-17. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.094>
- Rezasoltani, S., Amir Ebrahimi, N., Khadivi Boroujeni, R., Asadzadeh Aghdaei, H., & Norouzinia, M. (2021). Detoxification of aflatoxin M1 by probiotics *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus* in reconstituted milk. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2315–2324. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04901-5>
- Salem-Bekhit, M. M., Riad, O. K. M., Selim, H. M. R. M., Tohamy, S. T. K., Taha, E. I., Al-Suwayeh, S. A., & Shazly, G. A. (2023). Box–Behnken design for assessing the efficiency of aflatoxin M1 detoxification in milk using *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Life*, 13(8), 1667. <https://doi.org/10.3390/life13081667>
- Taşçı, F., Erol, Z., & Kocasarı, F. Ş. (2022). Investigation of aflatoxin M1 residue in raw cow milk samples in Burdur. *KSU Journal of Agriculture and Natural Sciences*, 25(Suppl 2), 497-505. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogan.vi.1031945000tp>
- Türkmen, N., Gürsoy, A. (2017). Fonksiyonel Dondurma. *Akademik Gıda* 15(4), (2017) 386-395. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.370110>
- Zhang, G., Li, J., Lv, J., Liu, L., Li, C., & Liu, L. (2019). Decontamination of aflatoxin M1 in yogurt using *Lactobacillus rhamnosus* LC-4. *Journal of Food Safety*, 39(3), e12673. <https://doi.org/10.1111/jfs.12673>
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Lepp, D., Shao, S., & Zhou, T. (2017). Strategies and methodologies for developing microbial detoxification systems to mitigate mycotoxins. *Toxins*, 9(4), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins9040130>



Bacteriocins as Food Bio-preservatives: Mechanism of Action, Purification and Characterization

Berna Öztürk^{1,a}, İlkin Yücel Şengün^{2,b,*}

¹*Istanbul Nişantaşı Üniversitesi, Sanat ve Tasarım Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, İstanbul, Türkiye*

²*Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye*

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 05.03.2024 Accepted : 26.08.2024</p> <p>Keywords: Bio-preservation Antimicrobial peptide Bacteriocin Food safety Food quality</p>	<p>In recent years, as consumers have increased their tendency to consume natural products, bio-preservatives that do not have negative effects, environmentally friendly and safer with high antimicrobial effects have become more important as alternative antimicrobial agents in the food industry. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria as a result of natural processes provide an important potential to ensure food safety and improve quality. Bacteriocins are antimicrobial peptides that are synthesized ribosomally in the logarithmic phase or at the end of the logarithmic phase and have an antagonistic effect. Bacteriocins have various mechanisms of action on Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as pore formation in the cell membrane and disruption of the cell wall structure. In order to characterize bacteriocins, it is very important that purification processes are efficient. Besides, it is of great importance to optimize the growth conditions of microorganisms in order to increase recovery efficiency. The heat stability of bacteriocins increases their usability in many foods processed at high temperatures. In this review study, the classification of bacteriocins, their mechanism of action, factors affecting their production, optimization, purification and characterization, as well as their inhibitory activities in food systems are discussed.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2375-2397, 2024

Gıda Biyokoruyucuları olarak Bakteriyosinler: Etki Mekanizması, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 05.03.2024 Kabul : 26.08.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Biyokoruma Antimikrobiyal peptit Bakteriyosin Gıda güvenilirliği Gıda kalitesi</p>	<p>Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünleri tüketmeye yönelik eğilimlerinin artması ile birlikte olumsuz etkileri olmayan, çevre dostu, güvenli ve yüksek antimikrobiyal etkiye sahip biyokoruyucular, gıda endüstrisinde alternatif antimikrobiyal ajanlar olarak daha önemli bir konuma gelmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından doğal süreçler sonucu üretilen bakteriyosinler gıda güvenilirliğinin sağlanması ve kalitesinin artırılması açısından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Bakteriyosinler logaritmik fazda ya da logaritmik fazın sonunda ribozomal olarak sentezlenen ve antagonistik etkiye sahip olan antimikrobiyal peptitlerdir. Bakteriyosinler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerine hücre zarında gözenek oluşumu ve hücre duvarı yapısının bozulması gibi çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Bakteriyosinlerin karakterize edilebilmesi için saflaştırma proseslerinin verimli olması oldukça önemlidir. Ayrıca, geri kazanım verimini arttırmak amacıyla mikroorganizmaların üreme koşullarının optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bakteriyosinlerin ısıya karşı stabil olmaları, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliklerini arttırmaktadır. Bu derleme çalışmasında, bakteriyosinlerin sınıflandırılması, etki mekanizması, üretimine etki eden faktörler, optimizasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonunun yanı sıra gıda sistemlerindeki inhibitör etkinlikleri ele alınmıştır.</p>

^a berna.ozturk@nisantasi.edu.tr

^{ib} <https://orcid.org/0000-0003-1104-1863>

^b ilkin.sengun@ege.edu.tr

^{ib} <https://orcid.org/0000-0001-6940-2129>



Giriş

Gıda kaynaklı tehlikeleri en aza indirmek, üretim ve tedarik zinciri boyunca ürün kalitesini optimize etmek gıda endüstrisi açısından büyük önem taşımaktadır. Farklı gıda gruplarının muhafazası amacıyla gıda endüstrisinde pek çok kimyasal madde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda tüketicilerin sağlıklı beslenme konusunda bilinçlenmesi ve kimyasal maddeler içeren gıdaların hastalıklardaki rolünün ortaya konulması ile birlikte tüm dünyada doğal antimikrobiyal etkileri bulunan katkıları içeren ürünleri tüketmeye yönelik eğilim artmıştır (İncili ve ark., 2022). Bu nedenle, laktik asit bakteri (LAB)'leri tarafından doğal süreçler sonucu üretilen metabolitlerin gıda güvenilirliği ve kalitesini sağlamak amacıyla kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanımına yönelik yapılan çalışmalar büyük önem kazanmıştır.

Biyokoruma, mikroorganizmaların ve/veya antimikrobiyal ürünlerinin, gıda güvenilirliğinin sağlanması ve raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanımını ifade etmektedir (Jo ve ark., 2021). Bu yöntem, gıdaların bozulması sebebiyle oluşan ekonomik kayıpların azaltılması, gıda zinciri boyunca patojen bulaşlarının engellenmesi, artan tüketici talepleri doğrultusunda besleyici değeri yüksek ve kaliteli gıdaların üretimi için uygulanan önemli bir tekniktir. Antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinen LAB'leri ve/veya bu mikroorganizmaların ürettikleri metabolik ürünler, biyokoruyucu maddeler olarak kabul edilmekte ve gıdaların doğal yolla korunmasını sağlayabilmektedir. LAB'lerinin antimikrobiyal etkisi, gıdaların pH değerini düşürerek mikrobiyal büyümeyi engelleyen laktik asit üretiminden ve ayrıca hidrojen peroksit, diasetil, ekzopolisakkarit (EPS) ve bakteriyosin gibi çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin üretiminden kaynaklanmaktadır (Moradi ve ark., 2021).

Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen peptit yapısındaki antimikrobiyal bileşiklerdir. Etki spektrumları bazı türlerle sınırlı olup, daha çok Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerine etkilidir ve genellikle üretici suşa yakın türlere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptir (Daba ve ark., 2022; Darbandi ve ark., 2022). Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit yapılarında olmaları ise, pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden ve mide salgılarından etkilenebildiklerini ve ayrıca insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Bununla birlikte, bazı bakteriyosinlerin ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (Verma ve ark., 2022). Bu nedenle, kimyasal koruyuculara alternatif olarak LAB'leri tarafından sentezlenen yeni bakteriyosinlerin tespit edilmesi gıda endüstrisi açısından önem arz eden bir konudur. Dolayısıyla, bu derleme çalışmasında bakteriyosinlerin tanımı, sınıflandırılması, etki mekanizması, saflaştırılması, karakterizasyonu ve gıda uygulamaları ele alınmıştır.

Bakteriyosinler: Genel Bakış

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ve antagonistik etkiye sahip olan antimikrobiyal peptitlerdir (Daba ve ark., 2022). Başta LAB'leri olmak üzere, *Bacillus* ve *Escherichia* gibi pek çok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir. Genellikle üretici suşa yakın türlere karşı antimikrobiyal etki gösteren bakteriyosinlerin etki spektrumları bazı türlerle sınırlı olup daha çok Gram-pozitif bakteriler üzerindedir (Bangar ve ark., 2022). Çizelge 1'de LAB'leri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler ve antagonistik etki gösterdikleri mikroorganizmalar verilmiştir.

Bakteriyosin ilk olarak 1925 yılında Andre Gratia tarafından, *Escherichia coli* V suşunun ürettiği ısıya dayanıklı bir madde olan Principle V'nin, *E. coli* F suşunun gelişimini engellemesi sonucu keşfedilmiştir (Gratia, 1925). Bu bakteriyosin, *E. coli*'de bulunan Col plazmiti tarafından kodlanması nedeniyle 1948 yılında Gratia ve Fredericq tarafından "kolicin" olarak adlandırılmıştır. 1928 yılında ise Rogers ve Whittier, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir maddenin *Lactobacillus bulgaricus* üzerine inhibitör etki gösterdiğini saptamıştır (Rogers, 1928). 1947 yılında Mattick ve Hirsch tarafından saflaştırılan bu madde "nisin" olarak adlandırılmıştır (Mattick & Hirsch, 1947). 1969 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yasal bir gıda katkı maddesi olarak kabul edilmiştir (Cogan & Hill, 1993). E234 koduyla gıda katkı maddeleri listesinde yer alan nisin, ilk olarak 1988 yılında ABD'de antibiyotiklerin gıdalarda kullanımının yasaklanmasıyla doğal koruyucu olarak kullanılmıştır. Günümüzde nisin altmıştan fazla ülkede gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne (2013) göre nisinin, krema ve toz krema, işlenmiş yumurta ve yumurta ürünleri, tatlılar, peynir ve peynir ürünlerinde gıda türüne bağlı olarak 3 mg/kg-L ve 12,5 mg/kg-L arasında değişen miktarlarda kullanımına izin verilmektedir. Çeşitli ülkelerde nisinin gıdalarda kullanım limitleri değişkenlik göstermektedir. Buna göre, Avustralya, Birleşik Krallık ve Fransa'da, peynir, peynir tozu ve konserve gıdalar için herhangi bir limit bulunmamaktadır. Rusya'da diyet peynirler ve konserve sebzeler için kullanım limiti maksimum 8000 IU/g iken, Amerika'da pastörize süttten üretilen peynirlerde maksimum 10000 IU/g nisin kullanımına izin verilmektedir (Gharsallaoui ve ark., 2015).

Ticari olarak kullanılan Pediocin PA-1 ise (Microgard™, Alta™ 2341) *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen ve yemeye hazır gıdalarda kullanılan bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosinin *Listeria monocytogenes*'in gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Niamah, 2018). Ticari olarak bakteriyosin üreten firmalar Çizelge 2'de gösterilmektedir.

Mikroorganizmalar kendi immün sistemlerini korumak ve diğer mikroorganizmaların antagonistik etkilerinden korunmak amacıyla bakteriyosin gibi çeşitli antimikrobiyal maddeler üretmektedir. Bakteriyosinlerin antibiyotik özellik göstermelerine rağmen, sentezlenme şekilleri, etki mekanizmaları, antimikrobiyal spektrumları, toksik etkileri, direnç mekanizmaları gibi özelliklerinin farklılık göstermesi nedeniyle antibiyotik olarak nitelendirilmesi yanlış bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 3).

Çizelge 1. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler

Table 1. Some bacteriocins produced by lactic acid bacteria

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Hedef mikroorganizma	Kaynaklar
Bakteriyosin GA15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> GA15	<i>Listeria innocua</i>	Daba ve ark., 2022
Enterocin HDX-2	<i>Enterococcus faecium</i> HDX-2	<i>Listeria monocytogenes</i>	Du ve ark., 2022
Bakteriyosin Y19-2	<i>Lactobacillus sakei</i> Y19	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	Fu ve ark., 2022
Enterocin ST20Kc	<i>Enterococcus faecium</i> ST20Kc	<i>Listeria monocytogenes</i>	Valledor ve ark., 2022
Enterocin ST41Kc	<i>Enterococcus faecium</i> ST41Kc		
Bakteriyosin RSQ04	<i>Lactococcus lactis</i> CGMCC20699	<i>Listeria monocytogenes</i>	Xiang ve ark., 2022
Bakteriyosin XJS01	<i>Lactobacillus salivarius</i> CGMCC2070	<i>Staphylococcus aureus</i>	Li ve ark., 2021
Plantacyclin B21AG	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> A6	<i>Listeria monocytogenes</i>	Parlindungan ve ark., 2021
Bakteriyosin BM173	<i>Lactobacillus crustorum</i> MN047	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	Qiao ve ark., 2021
Bakteriyosin COE20	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> COE20	<i>Staphylococcus aureus</i>	Onwuakor ve ark., 2021
Bakteriyosin ST110LD	<i>Leuconostoc citreum</i> ST110LD	<i>Listeria monocytogenes</i>	Woo ve ark., 2021
Bakteriyosin 1.0320	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> 1.0320	<i>Escherichia coli</i>	Xu ve ark., 2021
Bakteriyosin ZFM54	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> ZFM54	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Ye ve ark., 2021
Bakteriyosin MS1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MS1	<i>Bacillus cereus</i>	Salman ve ark., 2020
Bakteriyosin K10	<i>Pediococcus acidilactici</i> K10	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Seo & Kang, 2020
Bakteriyosin HW01	<i>Pediococcus acidilactici</i> HW01		
Plantaricin P1053	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> P1053	<i>Staphylococcus aureus</i>	De Giani ve ark., 2019
Pediocin ITV26	<i>Pediococcus acidilactici</i> ITV26	<i>Listeria innocua</i>	García-Toledo ve ark., 2019
Bakteriyosin DF01	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella Typhimurium</i>	Kim ve ark., 2019
Bakteriyosin ST16Pa	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ST16Pa	<i>Listeria innocua</i>	Sabo ve ark., 2019
Bakteriyosin Cys2-2	<i>Weissella confusa</i> Cys2-2	<i>Salmonella enterica</i>	Tenea & Lara, 2019
Bakteriyosin IN05	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> IN05	<i>Listeria monocytogenes</i>	Monafathia ve ark., 2018
Acidocin	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus cereus</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	Abeer Mohammed ve ark., 2017
Buchnericin LB	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Mahdi ve ark., 2016
Fermencin SD11	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SD11	<i>Streptococcus mutans</i>	Wannun ve ark., 2016

Çizelge 2. Bakteriyosin üreten bazı firmalar

Table 2. Some companies that produce bacteriocin

Firma ismi	Ülke	Bakteriyosin
MAYASAN® Biotech	Türkiye	Nisin
Chihon Biotechnology Co., Ltd.	Çin	Nisin
Danisco A/S	Danimarka	Nisin
DSM Food & Beverage	Hollanda	Nisin
Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd.	Çin	Nisin
Sivelee B.V.	Hollanda	Nisin
Quest International	ABD	Pediocin

Çizelge 3. Bakteriyosinler ve antibiyotikler arasındaki farklar

Table 3. Differences between bacteriocins and antibiotics

Özellik	Bakteriyosin	Antibiyotik
Uygulama alanı	Gıda/Klinik	Klinik
Sentez	Ribozomal	Sekonder metabolit
Biyoaktivite spektrumu	Çoğunlukla dar	Çoğunlukla geniş
Termal kararlılık	Yüksek	Düşük
Aktif pH aralığı	Geniş	Dar
Direnç geliştiren hedef hücrenin mekanizması	Hücre zarı bileşimindeki değişiklikler yoluyla adaptasyon	Genetik olarak aktarılabilen gen
Etki mekanizması	Genellikle gözenek oluşumu	Hücre zarı inhibisyonu
Proteolitik aktivite	Yüksek	Düşük
Saflaştırma	Yüksek verim	Düşük verim

Bakteriyosinler hızlı etki mekanizmaları sayesinde çok düşük konsantrasyonlarda dahi bakterilerin hedef zarında gözenekler oluşturabilmektedir. Bu nedenle, bakterilerin bakteriyosinlere karşı direnç mekanizması geliştirmesi, antibiyotiklere kıyasla oldukça zordur. Ayrıca, bakteriyosinler protein yapıya sahip olmaları nedeniyle antibiyotiklerden farklılık göstermekte ve proteolitik enzimler tarafından kolaylıkla parçalanabilmektedir. Bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran diğer önemli özellik ise ikincil metabolit olarak üretilen antibiyotiklere kıyasla daha basit biyosentetik mekanizmaya sahip birincil metabolit yapıları olmalarıdır (Nisa ve ark., 2023; Perez ve ark., 2014).

Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Bakteriyosinler Archaea'lar, Gram-negatif bakteriler ve Gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlenmektedir. *Halobacterium* tarafından üretilen halocin ve *Sulfolobus* tarafından üretilen sulfolobicin olmak üzere iki arkeocin tanımlanmıştır (Nisa ve ark., 2023; O'Connor ve Shand, 2002). Halocinler, *Halobacterium* türlerine karşı antagonistik etki göstermektedir. 36 amino asitten oluşan kısa bir hidrofobik peptid olan halocin S8, tanımlanan ilk mikrohalocindir. *S. islandicus* tarafından üretilen sulfolobicin, proteaza duyarlı ve ısıya dirençli bir archeocindir. Archeocinlerin sentezi besin elementlerinin azaldığı durağan fazda meydana gelmektedir (Riley ve Wertz, 2002).

E. coli tarafından üretilen kolicin, 1925 yılında Andre Gratia tarafından keşfedilen ilk bakteriyosindir. Daha sonra araştırmacılar, bakteriyosin üretiminin *E. coli* ile sınırlı olmadığını ve *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* gibi Gram-negatif bakterilerin de bakteriyosin ürettiğini bildirmiştir (Güllüce ve ark., 2013). *E. coli* tarafından üretilen bakteriyosinler dışında diğer tüm Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ısıya karşı duyarlıdır. Bu durum Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin en büyük dezavantajını oluşturmakta ve geniş ölçekte uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu nedenle, Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler bilim dünyasında daha fazla dikkat çekmektedir (Balciunas ve ark., 2013).

Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, birincil yapıları, moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translyasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerin varlığı ve etki mekanizmaları esas alınarak sınıflandırılmaktadır. Bu bakteriyosinler, ilk olarak 1993 yılında Klaenhammer tarafından dört sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre, sınıf I bakteriyosinler translyasyon sonrası modifiye edilmiş peptitleri, sınıf II bakteriyosinler translyasyon sonrası modifiye edilmemiş peptitleri, sınıf III bakteriyosinler ısıya duyarlı modifiye edilmemiş büyük peptitleri (30 kDa'dan büyük), sınıf IV bakteriyosinler ise karbonhidrat veya lipid kısımları olan kompleks proteinleri içermektedir (Klaenhammer, 1993). Cotter ve ark. (2005) tarafından yapılan başka bir sınıflandırmada bakteriyosinler iki kategoriye ayrılmış ve lantionin içeren bakteriyosinler sınıf I bakteriyosinler (lantibiyotikler), lantionin içermeyen bakteriyosinler ise sınıf II bakteriyosinler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, Cotter ve ark. (2005) tarafından,

Klaenhammer (1993) tarafından yapılan sınıflandırmada sınıf III ve sınıf IV olarak belirtilen bakteriyosinlerin yüksek molekül ağırlığına sahip olmaları sebebiyle, bu sınıfların "bakteriyosin" başlığı altında ayrı değerlendirilmesi gerektiği önerilmiştir.

En son güncellenen bakteriyosin sınıflandırma şeması Alvarez-Sieiro ve ark. (2016) tarafından önerilmiştir. Bu sınıflandırmada Gram-negatif bakterilere de yer verilmiş ve bakteriyosinler, sınıf I, II ve III olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır.

Sınıf I bakteriyosinler 10 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlığa sahip, ısıya dirençli ve translyasyon sonrası modifiye edilen peptitleri içermektedir (Çizelge 4). Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler veya lantipeptitler (grup Ia), halkasal veya siklik peptitler (grup Ib), saktibiyotikler veya saktipeptitler (grup Ic), lineer azol içeren peptitler (grup Id), glikolize edilmiş bakteriyosinler veya glycocinler (grup Ie) ve lasso peptitler (grup If) olmak üzere 6 alt gruba ayrılmaktadır (Alvarez-Sieiro ve ark., 2016; Choi ve ark., 2023). Grup Ia bakteriyosinleri, lantionin ve beta metil lantionin gibi sıra dışı amino asitlere sahip olmaları nedeniyle "lantibiyotikler" ya da "lantipeptitler" olarak adlandırılmaktadır. Bu bakteriyosinler, lantionin ve metil lantionin gibi yaygın olmayan amino asitlerin yanı sıra dehidre amino asitleri (dehidroalanin ve dehidrobutirin) de içermektedir. Grup Ib bakteriyosinler, N- ve C- terminal uçları bir peptid bağı ile bağlanan ve böylece halkasal bir molekül oluşturan translyasyon sonrası modifiye edilmiş peptitleri içermektedir. Grup Ic bakteriyosinler, kükürt-alfa karbon içeren ve "saktibiyotikler" ya da "saktipeptitler" olarak adlandırılan peptitlerdir. Lineer azol peptitleri içeren grup Id bakteriyosinler, ATP bağımlı siklodehidrasyon ve flavin mononükleotid bağımlı dehidrojenasyon ile oluşan serin, sistein ve treonin türevli tiazol ve metiloksaloz heterosiklik halkasal yapıların farklı kombinasyonlarını içermektedir. Grup Ie bakteriyosinler, glikolize edilmiş kalıntılar içermesi sebebiyle "glycocin" olarak adlandırılmaktadır. Grup If bakteriyosinler, amid bağı içermesi nedeniyle "lasso peptitler" olarak adlandırılmaktadır. Bu bakteriyosinler, antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra antikanser ve antiviral etkiler göstermektedir. Karakterize edilen ilk lasso peptid *E. coli* tarafından üretilen microcin J25'tir (Alvarez-Sieiro ve ark., 2016).

Sınıf II bakteriyosinler, 10 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlığa sahip, ısıya dirençli ve enzimatik olarak modifiye edilmemiş peptitleri içermektedir (Çizelge 4). Bu bakteriyosinler, yapısal özelliklerine göre dört alt gruba ayrılmaktadır. Grup IIa pediocin benzeri bakteriyosinleri, grup IIb iki peptid bakteriyosinleri, grup IIc halkasal bakteriyosinleri, grup IId ise diğer gruplara dahil olmayan lineer bakteriyosinleri içermektedir (Alvarez-Sieiro ve ark., 2016; Choi ve ark., 2023). Özellikle *Listeria* spp.'ye karşı etkili olan ve geniş spektruma sahip olan grup IIa bakteriyosinler, "pediocin benzeri bakteriyosinler" olarak da adlandırılmaktadır. Bu bakteriyosinler yüksek oranda korunmuş katyonik N- terminal bölgesi ve -YGNGV-amino asit dizisi içermektedir (Cui ve ark., 2012). Ayrıca grup IIa bakteriyosinler, disülfit bağları ile bağlanmış iki sistein kalıntısı içermekte ve bu disülfit bağının hidrofobik etkileşimle değiştirilmesi aktivite üzerinde olumsuz etkiye neden olmamaktadır (Sit ve ark., 2012). Çoğunlukla *Pediococcus* spp. tarafından üretilen bu bakteriyosinler,

Listeria spp. dahil olmak üzere çeşitli Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü inhibitör etki göstermektedir. Grup IIb bakteriyosinler, iki farklı peptitten oluşan modifiye edilmemiş antimikrobiyal maddelerdir. Bu peptitler ayrı ayrı test edildiklerinde genellikle çok düşük antibakteriyel aktivite sergilemektedirler. Grup IIc bakteriyosinler, N- ve C- terminal uçları kovalent bağ ile bağlı halkasal peptitlerdir. Lider peptitin parçalanmasına gerek kalmadan kolaylıkla sentezlenebilirler (Acedo ve ark., 2015). Grup IId bakteriyosinler, modifiye olmamış, lineer ve pediocin benzeri olmayan bakteriyosinleri içermektedir (Choi ve ark., 2023). *Propionibacterium* spp. tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğunluğu da bu gruba dahil edilmektedir (Heng ve ark., 2007).

Sınıf III bakteriyosinler, altmıştan fazla amino asit içeren (>10 kDa), ısıya duyarlı ve enzimatik olarak modifiye edilmemiş bakteriyosinlerdir (Çizelge 4). Bakteriyolisin olarak da adlandırılan bu bakteriyosinler 2 alt grupta değerlendirilmektedir (Choi ve ark., 2023). IIIa grubunda yer alan *L. helveticus* 1829 ve *S. staphylolyticus* tarafından üretilen helveticin V-1829 ve lysostaphin, hedef hücrenin parçalanmasına neden olan bakteriyolitik aktiviteye sahiptir. *S. zoepidemicus* tarafından üretilen zoocin A, D-alanil-L-alanil endopeptidazdır ve bu grup içerisinde en iyi karakterize edilen bakteriyolisindir. IIIb grubunda yer alan *L. helveticus* 481 ve *L. casei* tarafından üretilen helveticin J ve caseicin ise bakteriyolitik aktiviteye sahip olmayan bakteriyosinlerdir (Ge ve ark., 2019).

Çizelge 4. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Table 4. Classification of bacteriocins

Sınıf	Alt sınıf	Alt grup	Özellikler	Bakteriyosin-Üretici mikroorganizma	Kaynaklar
Sınıf I	Lantipeptitler	Ia	<ul style="list-style-type: none"> 10 kDa'dan düşük moleküler ağırlığa sahip Isıya dirençli Translasyon sonrası modifiye edilmiş Lantionin ve metil lantionin içeren 	Nisin- <i>Lactococcus lactis</i> Lakticin 3147- <i>Lactococcus lactis</i>	Malaczewska & Lukowska, 2021; Wu ve ark., 2022
	Siklik bakteriyosinler	Ib	<ul style="list-style-type: none"> N ve C terminal uçları bir peptit bağı ile bağlanmış Halkasal bir molekül 	Carnocyclin A- <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> Enterocin AS-48- <i>Enterococcus faecalis</i>	Martin-Visscher ve ark., 2008; Grande Burgos ve ark., 2014
	Saktipeptitler	Ic	<ul style="list-style-type: none"> Kükürtalfa karbon içeren peptitler ile donatılmış 	Subtilosin A- <i>Bacillus subtilis</i> Thuricin CD- <i>Bacillus thuringiensis</i>	Flühe ve ark., 2012; Mathur ve ark., 2017
	Lineer azol içeren peptitler	Id	<ul style="list-style-type: none"> Tiazol ve metiloksazol heterosiklik halkasal yapıların farklı kombinasyonlarını içeren Lineer peptitler 	Streptolicin S- <i>Streptococcus pyogenes</i>	Molloy ve ark., 2011
	Glycocinler	Ie	<ul style="list-style-type: none"> Glikolize edilmiş kalıntılara sahip 	Glycocin F- <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Microcin J25- <i>Escherichia coli</i>	Amso ve ark., 2018
	Lasso peptitler	If	<ul style="list-style-type: none"> Amid bağı içeren 	Capistruin- <i>Burkholderia thailandensis</i>	Braffman ve ark., 2019; Wang ve ark., 2020
Sınıf II	Pediocin benzeri bakteriyosinler	IIa	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek oranda korunmuş Nterminal bölgesi ve YGNGV amino asit dizisi içeren En az bir bisülfid bağına sahip Post translasyon sonrası modifiye edilmemiş Özellikle <i>Listeria</i> spp.'ye karşı etkili 	Enterocin A- <i>Enterococcus faecium</i> Pediocin PA-1- <i>Pediococcus acidilactici</i> Pediocin AcH- <i>Pediococcus acidilactici</i> Curvacin A- <i>Lactobacillus curvatus</i> Leucocin A-UAL 187- <i>Leuconostoc gelidum</i>	Mahdy ve ark., 2020; Fathizadeh ve ark., 2021; Heidari ve ark., 2022; Zhu ve ark., 2022
	İki peptit içeren bakteriyosinler	IIb	<ul style="list-style-type: none"> İki peptitin konjugasyonu 	Lactococcin G- <i>Lactococcus lactis</i>	Britton ve ark., 2020
	Lider peptit içermeyen bakteriyosinler	IIc	<ul style="list-style-type: none"> N ve C uçları arasında kovalent bağ ile bağlı halkasal peptitler 	Lactocyclin Q- <i>Lactococcus</i> sp.	Sawa ve ark., 2009
	Pediocin benzeri olmayan ve tek peptit içeren bakteriyosinler	IId	<ul style="list-style-type: none"> Lineer peptitler 	Garvieacin Q- <i>Lactococcus garvieae</i>	Tosukhowong ve ark., 2012
Sınıf III	Bakteriyolisin	IIIa	<ul style="list-style-type: none"> Bakteriyolitik Büyük ve hidrofilik polipeptitler 	Zoocin A- <i>Streptococcus zoepidemicus</i>	Chen ve ark., 2008
	Bakteriyolitik olmayan bakteriyosinler	IIIb	<ul style="list-style-type: none"> Bakteriyolitik olmayan Büyük polipeptitler 	Helveticin J- <i>Lactobacillus helveticus</i>	Zhang ve ark., 2013

Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması

Bakteriyosinler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Gram-negatif bakteriler, bakteriyosinlerin hücre zarına ulaşmasını önleyen dış koruyucu zara sahip olmaları nedeniyle, Gram-pozitif bakterilere kıyasla bakteriyosinlere karşı daha dirençlidir. Bununla birlikte, bakteriyosinlerin kimyasal yapılarındaki farklılıklar, protein sentezi inhibisyonu, DNA replikasyonu, transkripsiyon inhibisyonu, hücre duvarı yapısının bütünlüğünün bozulması ve hücre zarında gözenek oluşumu gibi çeşitli etki mekanizmaları göstermelerine neden olmaktadır (Cavera ve ark., 2015).

Gözenek Oluşumu

Pek çok bakteriyosin, hedef bakterilerin hücre zarı ile etkileşime girmelerini sağlayan fizikokimyasal ve yapısal özelliklere sahiptir. Bakteriyosinler lipit II molekülüne ya da mannoz fosfotransferaz sistemi reseptörüne bağlanarak hücre zarında gözenek oluşturmaktadır (Şekil 1). Gözenek oluşumu, negatif yüklü bir bakteri yüzeyi ile katyonik peptitler arasındaki elektrostatik çekim kuvveti tarafından başlatılmaktadır (Gabrielsen ve ark., 2012; Nisa ve ark., 2023). Gözenek oluşumu, proton itici gücün yok olmasına ya da bozulmasına neden olarak enerjinin tükenmesine ve hücre ölümüne yol açan hücre zarı geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Hücre zarı geçirgenliğinin artması düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan potasyum iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır. Hücrede neden olan bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre içi hayati önemi olan makro moleküllerin degradasyonuna ve bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik proseslerin inhibisyonuna yol açmaktadır (Galvez ve ark., 2014; Singh, 2018).

Hücre Duvarı Sentezinin Engellenmesi

Hücre duvarı; hücre morfolojisinin oluşması, hücre içi ozmotik basıncın düzenlenmesi ve hücresel bütünlüğün sağlanması gibi önemli işlevlere sahiptir. Bakteriyosinler hücre duvarının önemli bir molekülü olan lipit II molekülü ile etkileşime girerek hücre duvarı sentezinin engellenmesine neden olmaktadır (Şekil 1). Bununla birlikte, membrana bağlı peptidoglikan, lipit II molekülü ile bir kompleks oluşturarak hücre bölünmesini ve çoğalmasını zorlaştırmaktadır (Hasper ve ark., 2006; Nisa ve ark., 2023).

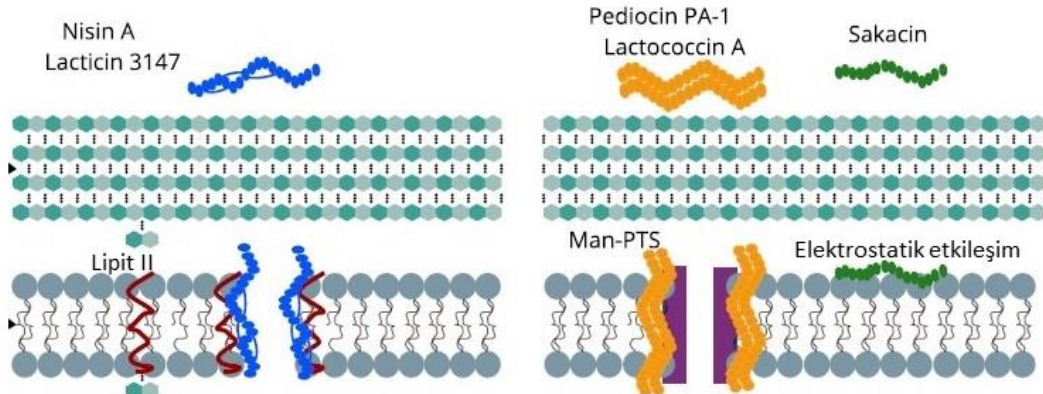
Bakteriyosinlerin Üretimi

Bakteriyosin üretimi, logaritmik fazda veya logaritmik fazın sonunda, biyokütle üretimi ile doğrusal orantılı olarak gerçekleşmektedir (da Costa ve ark., 2019). Bakteriyosinler, başlangıçta aktif olmayan peptitler olarak üretilmekte ve üretilen peptitlerin taşınması ve parçalanmasından sonra aktif bir forma dönüşmektedir (Darbandi ve ark., 2022). Hücre içinde sentezlenen bakteriyosinler aktivitelerini gösterebilmek için ABC taşıma sistemi ya da sec bağımlı lider dizisi içeren taşıyıcılar yardımıyla hücre dışına taşınmaktadır (Verma ve ark., 2022). Sınıf I ve sınıf II'ye dahil olan bakteriyosinlerin çoğu, hücre dışına ABC taşıma sistemi aracılığı ile taşınmaktadır. Bakteriyosinlerin salgılanmasına, özellikle glisin lider peptite sahip olan bakteriyosinlerde, ABC taşıma sistemi aracılık etmektedir (Daba ve ark., 2022).

Bakteriyosin Üretimini Belirlemek Amacıyla Kullanılan Yöntemler

Yeni bakteriyosinlerin aranması sırasında genellikle çeşitli gıda ve gıda dışı matrislerden izole edilen yüzlerce bakteri izolatu taranmaktadır. Bakteriyosin üretimini belirlemek amacıyla ilk olarak izolatların inhibisyon etkileri değerlendirilmelidir. Bu amaçla, spot inokülasyon, disk difüzyon, agar difüzyon veya sıvı dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Tüm bu yöntemler indikatör suşun bakteriyosin içeren süpernatant ile reaksiyonu prensibine dayanmaktadır. Broth dilüsyon yöntemi dışındaki diğer tüm testlerde bakteriyosin içeren süpernatantların inhibisyon etkisi, berrak inhibisyon zonlarının ölçülmesiyle belirlenmektedir. Broth dilüsyon yönteminde ise, süpernatantların inhibisyon etkisi, indikatör suş ve bakteriyosin içeren süpernatantların bulunduğu kuyucukların bulanıklığı ölçülerek belirlenmektedir (Kaşkoniené ve ark., 2017; Vijayakumar ve Muriana 2015).

Polimeraz zincir reaksiyonu testi bakteriyosin kodlayan genlerin varlığının hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir (Zou ve ark., 2018). Bu yöntemde, spesifik bir antimikrobiyal peptit, bu peptidin gen sekansına dayalı olarak taranabilmektedir. Bununla birlikte, farklı bakteriyosin üreten bakteri suşları bakteriyosin ile ilgili farklı gen dizileri içermeleri nedeniyle bakteriyosin üreten her bir suş için ayrı primer çiftlerinin tasarlanması gerekmektedir (Wang ve ark., 2020).



Şekil 1. Bakteriyosinlerin etki mekanizması (Man-PTS: mannoz fosfotransferaz sistemi)
Figure 1. Mechanism of action of bacteriocins (Man-PTS: mannose phosphotransferase system)

Çizelge 5. Karbon kaynaklarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Table 5. Mechanism of action of bacteriocins (Man-PTS: mannose phosphotransferase system)

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Besiyeri	Karbon kaynağı	Bakteriyosin üretimi	Kaynaklar
Bakteriyosin B21	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	Fruktoz Sakaroz Laktoz Maltoz Glikoz	%2 laktoz, maltoz ve glikoz ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi arttırılmıştır. Diğer karbon kaynaklarının ilavesi bakteriyosin aktivitesini değiştirmemiştir.	Parlindungan ve ark., 2021
Bakteriyosin ST16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	İnülin	%1 inülin ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi azalmıştır.	da Silva Sabo ve ark., 2015
Pediocin	<i>Pediococcus acidilactici</i>	MRS Broth	Fruktoz Maltoz Galaktoz Sorbitol Sakaroz Dekstroz Ramnoz Laktoz	%2 dekstroz ilavesi ile en yüksek bakteriyosin aktivitesi elde edilirken, en düşük aktivite %2 sorbitol veya mannoz ilavesi sonucu elde edilmiştir.	Neera ve ark., 2013
Bakteriyosin E204	<i>Enterococcus durans</i>	MRS Broth	Glikoz (%2, 3 ve 4)	%2 glikoz ilavesi ile en yüksek bakteriyosin aktivitesi elde edilmiştir.	Khay ve ark., 2012
Acidocin D20079	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	M17 Broth	Laktoz Glikoz Sakaroz Fruktoz Maltoz Galaktoz Ksiloz Arabinoz Mannoz Rafinoz	%0.5 laktoz ilavesi bakteriyosin üretimini yaklaşık 7 kat arttırmıştır. %0.5 glikoz ilavesinin bakteriyosin üretimi üzerine etkisiz olduğu, diğer karbon kaynaklarının ilavesinin ise bakteriyosin üretimini azalttığı tespit edilmiştir.	Abo-Amer, 2011
Bakteriyosin CWBI-B1430	<i>Enterococcus faecium</i>	M17 Broth	Arabinoz Fruktoz Galaktoz Glikoz Laktoz Maltodekstrin Maltoz Rafinoz Sakaroz Ksiloz	%1 laktoz ilavesi ile en yüksek bakteriyosin aktivitesi elde edilirken, diğer tüm karbon kaynaklarının bakteriyosin aktivitesini oldukça azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte %1 rafinoz ilavesi sonucu bakteriyosin aktivitesi gözlemlenmemiştir.	Aguilar-Galvez ve ark., 2011
Salivaricin CRL 1328	<i>Lactobacillus salivarius</i>	MRS Broth	Glikoz (%0,1 ve 2) Laktoz (%0,1 ve 2)	Glikoz ilavesi bakteriyosin üretimini arttırırken, laktoz ilavesi bakteriyosin üretimi üzerine etkisiz bulunmuştur.	Juárez Tomás ve ark., 2010

Bakteriyosin Üretimine Etki Eden Faktörler

Bakteriyosinler genellikle logaritmik fazın sonlarına doğru üretilen ve durağan faza ulaşıldığında üretimi sona eren birincil metabolitlerdir. Bu durum, bakteriyosin üretiminin bakteriyel toplam biyokütleyle bağlı olabileceği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, suşa bağlı olarak bakteriyosin üretimi durağan faza ulaşıldığında da başlayabilmektedir (Powell ve ark., 2007). Üretici suş, ortam bileşimi (karbonhidrat ve azot kaynakları, vb.) ve üreme koşulları (pH, sıcaklık, çalkalama vb.) gibi faktörler bakteriyosin üretimini etkilemektedir (Abbasili ve ark., 2017).

Ortam bileşiminin etkisi

LAB'lerinin aktivasyonu amacıyla kullanılan de Man Rogosa and Sharpe (MRS), Brain Heart Infusion, M17 ve Trypstone Soya Yeast Extract gibi farklı besi ortamları suşa bağlı olarak bakteriyosin üretimini teşvik edebilmektedir. Ancak, hücre metabolizması için gerekli olan bazı temel moleküllerin yetersizliği, logaritmik üreme fazında oluşabilecek besin eksikliği, demir ve kalsiyum gibi temel

minerallerin eksikliği vb. nedenlerden dolayı bazı suşlar için bu ortamlar bakteriyosin üretimi açısından yetersiz kalmakta ve bakteriyosin üretimini sağlayabilmek amacıyla ortama farklı karbon kaynakları, azot kaynakları ve sürfaktanlar gibi bileşenler ilave edilmektedir (Abbasili ve ark., 2017). Bazı LAB'leri stres koşullarında bakteriyosin üretebilmekte ve stres ortamı yaratabilmek amacıyla besi ortamına bazı bileşenler eklenmektedir. Bununla birlikte, bakteriyosin üretimini arttırabilmek amacıyla besi ortamına eklenen bileşenlerin fazla miktarlarda kullanılması bakteriyosin üretiminin inhibisyonuna yol açaabilmektedir (Parlindungan ve ark., 2021). Tüm bu nedenler, bakteriyosin üretimi için besiyeri bileşiminin önemini ortaya koymaktadır.

Glikoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, sakaroz, laktoz ve inülin gibi karbon kaynaklarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği birçoğu çalışma bulunmaktadır (Çizelge 5). LAB'lerinin farklı karbon kaynaklarını metabolize etme yeteneği, enzimlerin spesifik aktivitelerine dayanmaktadır. LAB'lerini geliştirmek amacıyla besiyerine

eklenen karbon kaynakları hücre gelişimini teşvik edebilirken, ortamda yüksek oranda karbon kaynağı bulunması bakteriyel üreme ve bakteriyosin üretimi üzerinde baskılayıcı etki oluşturabilmektedir (Peng ve ark., 2022). Üreme hızının düşmesine neden olan ozmotik basınç nedeniyle şeker ilavesi bazı durumlarda bakteriyosin üretiminde azalmalara sebep olmaktadır (Dimov ve ark., 2008). Parlindungan ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin B21 aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerini belirlemek amacıyla MRS Broth besiyerine 20 g/L glikoz, fruktoz, sakaroz, laktoz ve maltoz eklenmiştir. Besiyerine glikoz, laktoz ve maltoz ilavesi ile bakteriyosin aktivitesinin 2 kat arttığı, fruktoz ve sakaroz ilavesinin ise bakteriyosin aktivitesini değiştirmediği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. plantarum* ST202Ch tarafından üretilen BacST202Ch ve *L. plantarum* ST216Ch tarafından üretilen BacST216Ch aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının (20 g/L glikoz, fruktoz, laktoz, mannoz, maltoz ve sakaroz) etkileri incelenmiştir. En yüksek BacST202Ch aktivitesi besiyerine laktoz ve sakaroz ilave edildiğinde tespit edilmiştir. Bu durumun, laktoz ve sakarozun parçalanması ile BacST202Ch üretiminin eşzamanlı olmasından ve karbon katabolit baskısının ortadan kalkmasından kaynaklı olabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, en yüksek BacST216Ch aktivitesi besi ortamına glikoz ilave edildiğinde belirlenmiştir (Todorov ve ark., 2010).

Bakteriyosin üretimini arttırmak amacıyla kullanılan azot kaynakları arasında maya ekstraktı, sığır ekstraktı, pepton, malt filizi ve soya fasulyesi bulunmaktadır (Çizelge 6). Vitaminler, mineraller, amino asitler ve diğer

kolay tüketilebilir azot kaynakları açısından zengin olan maya ekstraktının mikrobiyal gelişme üzerindeki uyarıcı etkisi nedeniyle bakteriyosin üretimini arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. Peptitler, proteazlar ve serbest amino asitlerin karışımından oluşan, suda çözünür, ısıyla pıhtılaşmayan protein hidrolizatları olarak tanımlanan pepton, besi ortamlarında yaygın olarak kullanılan ve bakteriyosin üretiminin artmasına katkıda bulunan önemli bir organik azot kaynağıdır (Davami ve ark., 2014). Besi ortamına azot kaynağı eklenmesi sonucu bakteriyosin üretimi artmakta ve bu durumun nedeninin, azot kaynaklarında bulunan peptitler, mineraller ve vitaminler gibi üreme faktörlerinden kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Peng ve ark., 2022). Iyapparaj ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* sp. MSU3IR tarafından üretilen bakteriyosin MSU3IR aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının (amonyum asetat, amonyum klorür, amonyum nitrat, sodyum sülfat ve sodyum nitrat) etkileri incelenmiştir. En yüksek bakteriyosin üretimi amonyum asetat içeren besiyerinde, en düşük bakteriyosin aktivitesi ise sodyum nitrat içeren besiyerinde geliştirilen kültür tarafından elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, MRS Broth besiyeri %2.5 oranında süt tozu, kazein pepton, soya pepton ve peynir altı suyu proteini ile zenginleştirilmiş ve bu kaynakların *P. acidilactici* tarafından üretilen pediocin aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. En yüksek bakteriyosin aktivitesi soya pepton ile zenginleştirilmiş besiyerinde geliştirilen kültür tarafından elde edilmiştir (Neera ve ark., 2013).

Çizelge 6. Azot kaynaklarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Table 6. Effect of nitrogen sources on bacteriocin activity

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Besiyeri	Azot kaynağı	Bakteriyosin üretimi	Kaynaklar
Bakteriyosin B21	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	Proteaz pepton Sığır ekstraktı Maya ekstraktı	%2,5 proteaz pepton ve sığır ekstraktı ilavesi ile en yüksek bakteriyosin aktivitesi tespit edilmiştir. %2,5 maya ekstraktı ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi azalmıştır.	Parlindungan ve ark., 2021
Bakteriyosin MSU3IR	<i>Lactobacillus</i> sp.	MRS Broth	Amonyum asetat Amonyum klorür Amonyum nitrat Sodyum sülfat Sodyum sitrat Sodyum nitrat	En yüksek bakteriyosin üretimi amonyum asetat varlığında, en düşük bakteriyosin üretimi sodyum nitrat varlığında tespit edilmiştir.	Iyapparaj ve ark., 2013
Bakteriyosin E204	<i>Enterococcus durans</i>	MRS Broth	Tripton Maya ekstraktı Sığır ekstraktı	%2 tripton, %2 maya ekstraktı ve %3 maya ekstraktı ilavesi ile en yüksek bakteriyosin aktivitesi elde edilmiştir.	Khay ve ark., 2012
Bakteriyosin DF01	<i>Levilactobacillus brevis</i>	MRS Broth	Maya ekstraktı (%1 ve %3)	%1 maya ekstraktı ilavesi ile bakteriyosin üretimi artarken, %3 maya ilavesi sonucu bakteriyosin aktivitesi azalmıştır.	Lee ve ark., 2012
Acidocin D20079	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	M17 Broth	Sığır ekstraktı Maya ekstraktı Tripton Pepton Proteaz pepton Kazein	%1 maya ekstraktı ilavesi bakteriyosin üretimini etkilememiştir. Diğer azot kaynaklarının ilavesi ise bakteriyosin aktivitesini azaltmıştır.	Abo-Amer, 2011
Bakteriyosin CWBI-B1430	<i>Enterococcus faecium</i>	M17 Broth	Sığır ekstraktı Sığır peptonu Kazein Kazein pepton Proteaz Soy pepton Maya ekstraktı	En yüksek bakteriyosin üretimi %1,5 sığır ekstraktı ilavesi ile elde edilmesine rağmen, azot kaynağı ilavesinin bakteriyosin aktivitesi üzerine olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir.	Aguilar-Galvez ve ark., 2011

Çizelge 7. Sürfaktanların bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Table 7. Effect of surfactants on bacteriocin activity

Bakteriyosin	Üretici suş	Besiyeri	Sürfaktanlar	Bakteriyosin üretimi	Kaynaklar
Bakteriyosin GA15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	Tween 20 Tween 60 Tween 80 Triton X-100	%1 Tween 80 ve Triton X-100 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi 2 kat artmış, ancak %1 Tween 20 ve Tween 60 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi azalmıştır.	Daba ve ark., 2022
Bakteriyosin B21	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	Tween 20 Tween 40 Tween 80	0.5 mL/L, 1 mL/L ve 1.5 mL/L Tween 80 ile en yüksek bakteriyosin aktiviteleri tespit edilmiştir. 1 mL/L Tween 20 ve Tween 40 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi azalmıştır.	Parlindungan ve ark., 2021
Bakteriyosin ST110LD	<i>Leuconostoc citreum</i>	MRS Broth	Tween 80 Tween 20 EDTA SDS Gliserol	Kullanılan sürfaktanların bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir.	Woo ve ark., 2021
Bakteriyosin ST16Pa	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS Broth	Triton X-100 Tween 20 Tween 80 SDS Üre EDTA	En yüksek bakteriyosin aktivitesi %1 SDS ilavesi ile, en düşük bakteriyosin aktivitesi ise %1 Triton X-100 ilavesi ile elde edilmiştir.	Sabo ve ark., 2019
Bakteriyosin 63	<i>Lactococcus lactis</i>	MRS Broth	Tween 80 Tween 20 Triton X-100 SDS Üre	Tween 20 ve Triton X-100 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi 2 kat artmış, diğer sürfaktanlar ise bakteriyosin aktivitesini etkilememiştir.	Goyal ve ark., 2018
Bakteriyosin E204	<i>Enterococcus durans</i>	MRS Broth	Tween 80 (%0.1, 0.5 ve 1)	En yüksek bakteriyosin üretimi %0,5 Tween 80 ilavesi ile elde edilmiştir.	Khay ve ark., 2012
Sakacin A	<i>Lactobacillus sakei</i>	MRS Broth	Tween 80	Tween 80 ilavesinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir.	Trinetta ve ark., 2008

Tween 80, Tween 20, SDS ve EDTA gibi sürfaktanların bakteriyosin aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Çizelge 7). Besi ortamlarına sürfaktanların eklenmesi, bazı LAB'lerinin üremesini hızlandırabilmekte ve bakteriyosin konsantrasyonu artabilmektedir. Ayrıca, sürfaktanlar indikatör suşun duyarlılığını arttırabilmekte ve proteinli bileşiklerle miseller oluşturarak bakteriyosinleri stabilize edebilmektedir (Zendo ve ark., 2005). Goyal ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, sürfaktanların (Tween80, Tween 20, Triton X-100, SDS ve üre) *L. lactis* tarafından üretilen bakteriyosin 63 aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. %1 Tween 20 ve %1 Triton X-100 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesi iki kat artarken, Tween 80, SDS ve ürenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin B21 aktivitesi üzerine sürfaktanların etkilerinin belirlenmesi amacıyla MRS Broth besiyerine Tween 20, Tween 40 ve Tween 80 ilave edilmiştir. En yüksek bakteriyosin aktivitesi 0,5 mL/L, 1 mL/L ve 1,5 mL/L Tween 80 ilave edilen besiyerinde geliştirilen kültürler tarafından tespit edilmiştir. 1 mL/L Tween 20 ve Tween 40 ilavesi ile bakteriyosin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Parlindungan ve ark., 2021).

Üreme koşullarının etkisi

Bakteriyosin üretimi için sıcaklık ve besi ortamının pH değeri oldukça önemli parametrelerdir. LAB'lerinin metabolik aktivitesi sıcaklık ve pH değerinden önemli ölçüde etkilenmekte ve bu nedenle bakteriyosin aktivitesi

sıcaklık ve pH değerine göre değişebilmektedir. Bazı LAB'leri için bakteriyosin üretimi optimum olmayan üreme koşullarında artmaktadır (Rajaram ve ark., 2010; Abo-Amer, 2011). Bakteriyosin üretimi için optimum sıcaklık ve pH değerleri suşa ve kullanılan besiyerine bağlı olarak değişim göstermektedir. Malheiros ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. sakei* tarafından üretilen bakteriyosin 2a aktivitesi üzerine farklı pH (4,5, 5, 5,5 ve 6) ve sıcaklık (25, 30, 37 ve 40°C) değerlerinin etkileri incelenmiştir. En yüksek bakteriyosin aktivitesi pH 5 ve 5.5 değerlerinde tespit edilmiş, pH 4.5 değerinde ise bakteriyosin üretiminin olmadığı belirlenmiştir. Bakteriyosin üretimi üzerine sıcaklığın etkisi değerlendirildiğinde ise, en yüksek bakteriyosin aktivitesi 25 ve 30°C değerlerinde tespit edilmiş, 37 ve 40°C değerlerinde ise bakteriyosin üretiminin olmadığı belirlenmiştir.

Bakteriyosin üretimi ortamdaki oksijen varlığından, üretici suşa bağlı olarak pozitif ya da negatif yönde etkilenmektedir. Abbasiliasi ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, oksijen varlığının *Lacticaseibacillus paracasei* tarafından üretilen bakteriyosin LA07 üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla kültür hem aerobik/anaerobik koşullarda hem de çalkalama işlemine (100 ve 200 rpm) tabi tutularak aktifleştirilmiştir. Çalkalama işleminin bakteriyosin aktivitesini arttırdığı ve anaerobik koşullarda bakteriyosin üretiminin daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, *L. mesenteroides* tarafından üretilen bakteriyosin 8293 aktivitesi üzerine çalkalama işleminin

etkisini belirlemek amacıyla, kültür 100, 150, 200 ve 250 rpm'de çalkalanarak geliştirilmiş ve çalkalama işleminin bakteriyosin aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Danial ve ark., 2016). da Silva Sabo ve ark. (2015) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, çalkalama işleminin *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin ST16 Pa aktivitesi üzerine etkisi incelemiş ve 100 rpm'de çalkalama ile bakteriyosin üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, oksijen varlığının bakteriyosin aktivitesini üretici suşa bağlı olarak önemli ölçüde değiştirebileceğini ortaya koymaktadır.

Bakteriyosin Üretiminin Optimizasyonu

Mikroorganizmaların üreme koşullarının optimizasyonu ticari ölçekte yüksek performanslı bakteriyosin üretimi için kritik bir öneme sahiptir. Üreme

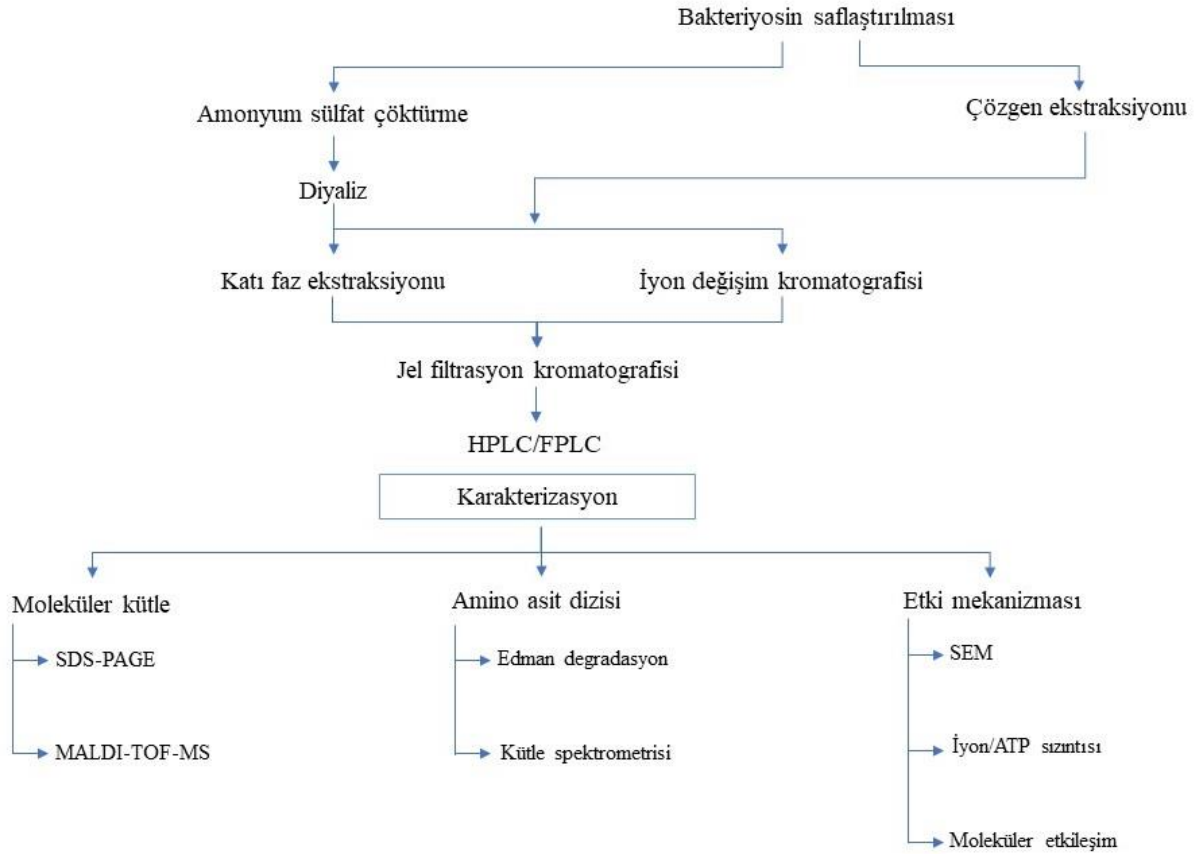
koşullarının optimizasyonu sadece bakteriyosin üretimini artırmak için değil, aynı zamanda maliyetin düşürülmesi açısından da önemli bir faktördür. Bakteriyosin üretimi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, besiyerinin pH değeri, karbon kaynağı ve azot kaynağı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Lahiri ve ark., 2021). Besiyerinin formülasyonu sadece bakteriyosin üretimini arttırmayı değil, aynı zamanda üretimi stabilize etmeyi de amaçlamaktadır. Üreme koşullarının veya ortam bileşiminin optimizasyonu ile yüksek üretim verimleri elde edilmektedir.

Literatürde istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birleştirilmiş bir yöntemi olan yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak bakteriyosin üretimi için LAB'lerinin üreme koşullarını optimize etmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 8).

Çizelge 8. Bakteriyosin üretiminin optimizasyonu

Table 8. Optimization of bacteriocin production

İstatistiksel yöntem	Değişkenler	Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Hedef mikroorganizma	Maksimum bakteriyosin üretimi	Kaynaklar
RSM-CCD	Tween 80 (1-5 mL/L) KCl (2-6 g/L) Triamonyumsitrat (2-6 g/L)	Bakteriyosin GA15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Listeria innocua</i>	12800 AU/mL (3 mL/L Tween80, 3 g/L KCl, 6 g/L triamonyumsitrat)	Daba ve ark., 2022
RSM-CCD	Sıcaklık (28-32°C) pH (5,5-5,5) NaCl (%1,5-2,5)	Bakteriyosin COE20	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	11.62 mm (31°C, pH 5.9, %1,9 NaCl)	Onwuakor ve ark., 2021
RSM-CCD	Sıcaklık (27-33°C) pH (5,2-6,8) NaCl (%1,2-2,8)	Bakteriyosin MT186647	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	12.31 mm (30,5°C, pH 5,9, %1,94 NaCl)	Onwuakor ve ark., 2020
RSM-Box Behnken	Sıcaklık (15, 30 ve 45°C) pH (3, 6 ve 9) Süre (4, 18 ve 32 saat)	Bakteriyosin MS1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	2600 AU/mL (30°C, pH 6, 18 saat)	Salman ve ark., 2020
RSM-Doehlert	Melas (20-50 g/L) Sıcaklık (21,34-38,66°C) Süre (5,13-32,87 saat)	Nisin 2MT	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3600 AU/mL (42,72 g/L melas, 28,40°C, 17,05 saat)	Kaktcham ve ark., 2019
RSM-CCD	Glikoz (4-7 g/L) pH (4-8) Sıcaklık (20-40°C) Maya ekstraktı (4-16 g/L)	Bakteriyosin IN05	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	3306 AU/mL (5,5 g/L glikoz, pH 6, 30°C, 12 g/L maya ekstraktı)	Monafathia ve ark., 2018
RSM-Box Behnken	pH (4-8) Glikoz (1-10 g/L) Sıcaklık (20-40°C) Tween 20 (5,75-20 µL/mL)	Bakteriyosin 2a	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	12800 AU/mL (pH 6,28, 5,5 g/L glikoz, 25°C, 10,5 µL/mL Tween 20)	Malheiros ve ark., 2015
RSM-CCD	Laktoz (2-18 g/L) Sıcaklık (18-32°C)	Bakteriyosin LPSO4	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	640 AU/mL (14,85 g/L laktoz, 25,59°C)	Hwanhlem ve ark., 2014
RSM-CCD	Kazein pepton (%0,75-5,75) Dekstroz (%0,25-5,25) pH (3-11) Sıcaklık (15-55°C)	Pediocin	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	535 AU/mL (%3,97 kazein pepton, %3,45 dekstroz, pH 7, 35°C)	Neera ve ark., 2013
RSM-Box Behnken	pH (5-9) Süre (6-30 saat) Sıcaklık (29.50-39.50°C)	Bakteriyosin LA-1	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	4652,15 AU/mL (pH 7,19, 33,3°C, 22.2 saat)	Kumar ve ark., 2012
RSM-CCD	Maya ekstraktı (5-15 g/L) Glikoz (10-30 g/L) pH (4,5-8,5)	Bakteriyosin DF01	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1280 AU/mL (14,56 g/L maya ekstraktı, 28,95 g/L glikoz, pH 6,8)	Lee ve ark., 2012



Şekil 2. Bakteriyosin saflaştırılması ve karakterizasyonu
Figure 2. Bacteriocin purification and characterization

Qiao et al. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecium* TJUQ1 suşunun optimum düzeyde bakteriyosin ürettiği (816.87 AU/mL) koşullar 15,20 g/L sıgır ekstraktı ve 1,93 g/L K_2HPO_4 içeren pH değeri 7,19'a ayarlanmış besi ortamı olarak tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. lactis* Gh1 suşunun 17,53 g/L soya pepton, 4 g/L fruktoz, 2,5 g/L NaCl ve 1,5 g/L Na_2HPO_4 içeren besi ortamlarında optimum düzeyde bakteriyosin (695,96 AU/mL) ürettiği belirlenmiştir (Jawan ve ark., 2021). Salman ve ark. (2020) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *L. acidophilus* MS1 suşunun optimum düzeyde bakteriyosin ürettiği koşullar belirlenmiş ve en yüksek bakteriyosin aktivitesi (2600 AU/mL) inkübasyon sıcaklığının 30°C, pH değerinin 6 ve inkübasyon süresinin 18 saat olduğu koşullarda tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. rhamnosus* L43 suşunun optimum düzeyde bakteriyosin ürettiği koşullar tespit edilmiş ve en yüksek bakteriyosin aktivitesi (1680 AU/mL) besiyerine ilave edilen NaCl konsantrasyonunun %2, pH değerinin 7 ve inkübasyon süresinin 18 saat olduğu koşullarda belirlenmiştir (da Costa ve ark., 2019). Yapılan tüm bu çalışmalar, bakteriyosin üretiminin birçok faktöre bağlı olduğunu ve koşulların optimize edilmesiyle bakteriyosin üretiminin artırılabilirliğini ortaya koymaktadır.

Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Bakteriyosinlerin saflaştırılması amacıyla çözgen ekstraksiyonu, amonyum sülfat çöktürme, katı faz ekstraksiyonu, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi

(HPLC) gibi çeşitli yöntemler kullanılmakta (Şekil 2) ve literatürde bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Çizelge 9).

Abanoz ve Kunduhoglu (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemleri kullanılarak saflaştırılan bakteriyosin KT11 (*E. faecalis*)'in spesifik aktivitesinin sırasıyla 25,87 ve 26,31 kat arttığı ve iki aşamalı saflaştırma sonucu bakteriyosin KT11'in %15,97 geri kazanım verimi ile elde edildiği bildirilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, bakteriyosin ST16Pa (*L. plantarum*) amonyum sülfat çöktürme ve katı faz ekstraksiyonu yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış, spesifik aktivitenin 1, 2 ve 13,71 kat arttığı ve bakteriyosin ST16Pa'nın üç aşamalı saflaştırma sonucu %2 geri kazanım verimi ile elde edildiği belirlenmiştir (Sabo ve ark., 2019). Lahiri ve ark. (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *L. lactis* tarafından üretilen leucocin SM amonyum sülfat çöktürme, jel filtrasyon kromatografisi ve HPLC yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış, spesifik aktivitenin sırasıyla 83, 551 ve 4999 kat arttığı ve leucocin SM'nin üç aşamalı saflaştırma sonucu %34,75 geri kazanım verimi elde edildiği bildirilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar, bakteriyosin saflaştırılması sonucu elde edilen verimin bakteriyosin üreten suşa ve kullanılan yönteme bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Geri kazanım veriminin düşük olması, saflaştırma aşamalarında bakteriyosin kaybının fazla olduğu anlamına gelmektedir. Verimi arttırmak amacıyla besiyeri pH değeri, inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerin optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Çizelge 9. Bakteriyosin saflaştırma aşamaları

Table 9. Bacteriocin purification steps

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Saflaştırma aşamaları	Verim (%)	Kaynaklar
Enterocin HDX-2	<i>Enterococcus faecium</i>	Amonyum sülfat çöktürme	83,76	Du ve ark., 2022
		Katı faz ekstrasyonu	44,80	
		Katyon değişim kromatografi	11,07	
		RP-HPLC	6,38	
Bakteriyosin ZFM54	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Katyon değişim kromatografi	11,45	Ye ve ark., 2021
		Jel filtrasyon kromatografi	0,72	
		HPLC	0,51	
Leucocin SM	<i>Leuconostoc lactis</i>	Amonyum sülfat çöktürme	87,50	Lahiri ve ark., 2020
		Jel filtrasyon kromatografi	43,75	
		HPLC	34,75	
Bakteriyosin LF-BZ532	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Amonyum sülfat çöktürme	52,00	Rasheed ve ark., 2020
		Katyon değişim kromatografi	6,00	
		HPLC	0,85	
Bakteriyosin MS1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Amonyum sülfat çöktürme	42,20	Salman ve ark., 2020
		Katyon değişim kromatografi	2,10	
		Jel filtrasyon kromatografi	1,10	
Enterocin TJUQ1	<i>Enterococcus faecium</i>	Amonyum sülfat çöktürme	65,56	Qiao ve ark., 2020
		Ters faz kromatografi	13,64	
		Katyon değişim kromatografi	10,49	
Pediocin ITV26	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Adsorpsiyon-desorpsiyon	29,05	García-Toledo ve ark., 2019
		Ultrafiltrasyon	1,30	
Bakteriyosin ST16Pa	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Amonyum sülfat çöktürme	40,00	Sabo ve ark., 2019
		Katı faz ekstraksiyon	2,00	
Bakteriyosin KT11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amonyum sülfat çöktürme	23,96	Abanoz & Kunduhoglu, 2018
		Diyaliz	15,97	
Bakteriyosin DY4-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Etil asetat ekstraktı	40,00	Lv ve ark., 2018
		Ultrafiltrasyon	16,00	
		Jel filtrasyon kromatografi	4,80	
		HPLC	1,60	
Bakteriyosin J23	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Amonyum sülfat çöktürme	48,00	Zhang ve ark., 2018
		Katyon değişim kromatografi	11,36	
Bakteriyosin BK61	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amonyum sülfat çöktürme	24,00	Lim, 2015
		Katyon değişim kromatografi	16,00	
		Hidrofobik etkileşim kromatografi	4,00	
		RP-HPLC	2,00	
Bakteriyosin BK11	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Amonyum sülfat çöktürme	66,00	Mahmood ve ark., 2015
		Katyon değişim kromatografi	32,00	
		Jel filtrasyon kromatografi	24,00	
		RP-FPLC	6,00	
Bakteriyosin TLBFT06	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Amonyum sülfat çöktürme	80,00	Mahmood ve ark., 2015
HPLC	0,10			

Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu

Bakteriyosinlerin karakterize edilebilmesi için saflaştırma proseslerinin verimli olması çok önemlidir. Bu amaçla, bakteriyosinlerin enzim, pH, sıcaklık gibi faktörlere karşı stabiliteyi, moleküler büyüklükleri ve amino asit dizilimleri belirlenmektedir.

Literatürde bakteriyosinlerin farklı enzim, pH, sıcaklık ve sürfaktan gibi faktörlere karşı stabiliteyi incelenen pek çok çalışma mevcuttur (Çizelge 10). Daba ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin GA15'in farklı enzim (proteinaz K, α -kimotripsin, pepsin ve katalaz), pH (3-12), sıcaklık (40°C'de 15 ve 30 dakika, 60°C' 15 ve 30 dakika, 80°C' 15 ve 30 dakika, 100°C' 15 ve 30 dakika, 121°C 15 dakika) ve sürfaktan (Tween 20, Tween 60, Tween 80 ve Triton X-100) uygulamalarına karşı stabiliteyi incelenmiştir. Katalaz dışındaki diğer enzim uygulamalarında bakteriyosin aktivitesi tespit edilememiştir. 40°C, 60°C ve 80°C sıcaklık uygulamalarında bakteriyosin aktivitesini korumuş, 100°C

sıcaklık uygulamalarında bakteriyosin aktivitesi azalmış ve 121°C sıcaklık uygulamasında ise bakteriyosin aktivitesi belirlenmemiştir. Bakteriyosin GA15 pH stabilitesi açısından değerlendirildiğinde, 7,5 ve altındaki pH değerlerinde bakteriyosin aktivitesini korumuş, 8-9,5 pH aralığında bakteriyosin aktivitesi azalmış ve 10-12 pH aralığında bakteriyosin aktivitesi gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, Tween 80 ve Triton X-100 uygulamalarında bakteriyosin aktivitesi artış gösterirken, Tween 20 ve Tween 60 uygulamalarında bakteriyosin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, *E. faecium* tarafından üretilen enterocin TJUQ1'in farklı enzim (tripsin, proteinaz K, papain, pepsin, amilaz ve lipaz), pH (3, 5, 7, 9 ve 11), sıcaklık (37°C'de 30 dakika, 60°C'de 30 dakika, 80°C'de 30 dakika, 100°C'de 30 dakika ve 121°C'de 15 dakika), çözen (ethanol, kloroform, aseton, asetonitril ve benzen) ve sürfaktan (Tween 20, Tween 80, üre ve SDS) uygulamalarına karşı stabiliteyi incelenmiştir.

Çizelge 10. Bakteriyosinlerin çeşitli faktörlere karşı stabiliteyi

Table 10. Stability of bacteriocins against various factors

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Hedef mikroorganizma	Stabilite	Kaynaklar	
Bakteriyosin GA15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149	Enzim pH Sıcaklık Sümfaktan	Katalaz 3, 3,5, 4,4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 ve 9,5 40°C, 60°C, 80°C ve 100°C'de 15 ve 30 dakika Tween 20, Tween 60, Tween 80 ve Triton X-100	Daba ve ark., 2022
Enterocin HDX-2	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Enzim pH Çözgen Sümfaktan Metal iyon	Tripsin, proteinaz K, α-amilaz, papain, lipaz, katalaz ve α-kimotripsin 2, 4, 6, 8 ve 10 Metil alkol, etil alkol, propil alkol, bütanol, hekzan, kloroform ve aseton Tween 20, Tween 80, SDS, üre, EDTA, Triton X-100 Na ⁺ , K ⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ ve Ca ²⁺	Du ve ark., 2022
Bakteriyosin KLDS 1.0338	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	Enzim pH Sıcaklık Çözgen Sümfaktan Metal iyon NaCl	Papain, proteinaz K, α-kimotripsin ve α-amilaz 2-12 40°C, 60°C, 80°C ve 100°C'de 15 ve 30 dakika Metanol, etanol, izopropanol, bütanol, triklorometan ve aseton Üre, SDS, EDTA, Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ⁺ , Fe ²⁺ , Zn ⁺ ve Mn ²⁺ %2, 4, 6, 8, 10 ve 12	Ma ve ark., 2020
Bakteriyosin LF-BZ532	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Escherichia coli</i>	Enzim pH Sıcaklık	Katalaz 2, 4, 6 ve 8 37°C'de 1 saat, 50°C, 80°C ve 100°C'de 30 dakika ve 121°C'de 20 dakika	Rasheed ve ark., 2020
Bakteriyosin 2MT	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Enzim pH Sıcaklık Sümfaktan	Katalaz, tripsin, α-amilaz ve lipaz 2-10 100°C'de 30 dakika, 121°C'de 15 ve 30 dakika SDS, Tween 80, Tween 20, üre	Kaktcham ve ark., 2019
Bakteriyosin 607A	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Sıcaklık	80°C ve 90°C'de 30 dakika	Chen ve ark., 2018
Bakteriyosin DY4-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Enzim pH Sıcaklık	Proteaz 2,5, 3,5, 4,5 ve 5,5 50°C, 100°C ve 121°C'de 30 dakika	Lv ve ark., 2018
Fermencin SA715	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	Enzim pH Sıcaklık	Proteinaz K, lizozim, proteaz, katalaz, tripsin ve α-kimotripsin 2-10 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C'de 30 dakika	Wayah & Philip, 2018
Fermencin SD11	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	Enzim pH Sıcaklık	α-amilaz, katalaz ve lizozim 3-7 60°C ve 80°C'de 5, 10 ve 20 dakika	Wannun ve ark., 2016
Bakteriyosin BK61	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Enzim pH Sıcaklık	Proteinaz K, pepsin, tripsin, lizozim, katalaz, α-amilaz, lipaz 2-12 100°C'de 10, 20 ve 30 dakika, 121°C'de 15 dakika	Lim, 2015
Bakteriyosin BK11	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Enzim pH Sıcaklık	Proteaz, proteinaz K, pepsin, tripsin, lizozim, katalaz, α-amilaz, lipaz 2-12 100°C'de 10, 20 ve 30 dakika, 121°C'de 15 dakika	Lim, 2015
Bakteriyosin CN-25	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Enzim pH Sıcaklık	Lipaz ve katalaz 2-12 60°C, 80°C ve 100°C'de 5 ve 30 dakika, 121°C'de 15 dakika	Sonsa-Ard ve ark., 2015
Bakteriyosin DT24	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Escherichia coli</i>	Enzim pH Sıcaklık	α-amilaz, pepsin ve katalaz 2, 4, 6, 8 ve 10 30°C, 45°C, 60°C, 75°C ve 100°C'de 1 saat	Trivedi ve ark., 2013

Çizelge 11. Bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğü

Table 11. Molecular size of bacteriocins

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Yöntem	Moleküler büyüklük	Kaynaklar
Bakteriyosin GA15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	SDS-PAGE MALDI-TOF-MS	3.3-6.5 kDa 4.369 kDa	Daba ve ark., 2022
Enterocin HDX-2	<i>Enterococcus faecium</i>	SDS-PAGE MALDI-TOF-MS	3.3-6.5 kDa 5.482 kDa	Du ve ark., 2022
Bakteriyosin Y19-2	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	SDS-PAGE	20 kDa	Fu ve ark., 2022
Bakteriyosin 1.0320	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	SDS-PAGE	1-3.3 kDa	Xu ve ark., 2021
Bakteriyosin ZFM54	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MALDI-TOF-MS	1.143 kDa	Ye ve ark., 2021
Bakteriyosin KLDS 1.0338	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	SDS-PAGE	6.8 kDa	Ma ve ark., 2020
Bakteriyosin SLG10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MALDI-TOF-MS	1.422 kDa	Pei ve ark., 2020
Enterocin TJUQ1	<i>Enterococcus faecium</i>	SDS-PAGE MALDI-TOF-MS	3.3-6.5 kDa 5.520 kDa	Qiao ve ark., 2020
Bakteriyosin LF-BZ532	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MALDI-TOF-MS	1.105 kDa	Rasheed ve ark., 2020
Bakteriyosin 2MT	<i>Lactococcus lactis</i>	SDS-PAGE	4.10 kDa	Kaktcham ve ark., 2019
Bakteriyosin Cys2-2	<i>Weissella confusa</i>	SDS-PAGE	10 kDa	Tenea & Lara, 2019
Bakteriyosin 607A	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	MALDI-TOF-MS	4.623 kDa	Chen & ark., 2018
Bakteriyosin KS400	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SDS-PAGE	≈ 7.5 kDa	Gaspar ve ark., 2018
Bakteriyosin DY4-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MALDI-TOF-MS	1.465 kDa	Lv ve ark., 2018
Fermencin SA715	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MALDI-TOF-MS	1.792 kDa	Wayah & Philip, 2018
Bakteriyosin J23	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	SDS-PAGE	≈ 6.73 kDa	Zhang ve ark., 2018
Bakteriyosin HW01	<i>Pediococcus acidilactici</i>	SDS-PAGE	≈ 6 kDa	Ahn ve ark., 2017
Fermencin SD11	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	SDS-PAGE MALDI-TOF-MS	33 kDa 33.593 kDa	Wannun ve ark., 2016
Bakteriyosin FT259	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	SDS-PAGE	3.900 kDa	Winkelströter ve ark., 2015
Caseicin TN2	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	SDS-PAGE MALDI-TOF-MS	5-10 kDa 6.352 kDa	Lü ve ark., 2014
Bakteriyosin DPTLB3	<i>Levilactobacillus brevis</i>	SDS-PAGE	54 kDa	Banerjee ve ark., 2013
Bakteriyosin DT24	<i>Levilactobacillus brevis</i>	SDS-PAGE	≈ 7 kDa	Trivedi ve ark., 2013

Amilaz ve lipaz uygulamalarında bakteriyosin aktivitesini korurken, diğer enzim uygulamalarında bakteriyosin aktivitesi gözlemlenmemiştir. pH, sıcaklık, çözen ve sürfaktan uygulamalarında ise bakteriyosin aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Qiao ve ark., 2020). Elde edilen tüm bu sonuçlar, bakteriyosin stabilitesinin bakteriyosin çeşidine ve pH, sıcaklık, enzim uygulamaları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) yöntemleri bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğünü tespit etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Gao ve ark., 2015). SDS-PAGE yönteminde proteinlerin yapısının düz zincir haline dönüştürülebilmesi ve proteinlerin negatif yüklerle yüklenebilmesi amacıyla SDS, disülfid bağlarını kırmak amacıyla merkaptotanol gibi indirgeyici ajanlar ve polimerizasyon için serbest radikallerinin oluşumu amacıyla amonyum persülfat kullanılmaktadır. Jel oluşumu, akrilamid ve akrilamid türevi N-N-metilen bis-akrilamidin polimerizasyonu sonucu meydana gelmekte ve örnekler bu jelde yürütülmektedir. Akrilamid molekülleri polimerizasyon için yan yana bağlanarak düz zincir

oluştururlar. Bis-akrilamid molekülleri, iki akrilamid molekülü arasında çapraz bağlar oluşturarak ağısı yapı oluşumunu sağlamaktadır. Por büyüklüğü, akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. Alt ayırma jeli ise proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayırmaktadır (Brunelle ve ark., 2014). MALDI-TOF-MS yöntemi ile geniş bir kütle aralığında yüksek hassasiyetle hızlı bir şekilde makromoleküllerin moleküler ağırlığı ve yapısal karakterizasyonu belirlenebilmektedir (Mercado & Olmos, 2022). Literatürde SDS-PAGE yöntemi kullanılarak bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğünün incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Çizelge 11). Qiao ve ark. (2020) ve Du ve ark. (2022), *E. faecium* TJUQ1 ve *E. faecium* HDX-2 tarafından üretilen bakteriyosin TJUQ1 ve bakteriyosin HDX-2'nin moleküler büyüklüğünün 3.3-6.5 kDa aralığında olduğunu bildirmiştir. Ahn ve ark. (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *P. acidilactici* tarafından üretilen bakteriyosin HW01'in moleküler büyüklüğünün yaklaşık 6 kDa olduğu belirtilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, *P. pentosaceus* tarafından üretilen bakteriyosin VJ13'ün moleküler büyüklüğünün 4 kDa olduğu bildirilmiştir (Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2013).

Edman degradasyon, sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS) ve

MALDI-TOF-MS yöntemleri amino asit dizisini belirlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Edman degradasyonu yönteminde sadece N-terminal amino asidi analiz edilmekte ve peptidin geri kalanı korunmaktadır. Ayrıca, bu yöntemde polipeptitlerin amino asit dizilimleri tam olarak tespit edilmektedir. Bununla birlikte, sınıf I bakteriyosinlerde bulunan lantionin ve metil lantionin gibi modifiye edilmiş amino asitler bu yöntem kullanılarak tanılanamamaktadır (Lohans & Vederas, 2014). Edman degradasyon yöntemine alternatif olarak LC-ESI-MS ya da MALDI-TOF-MS yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde sekans tanılanması spesifik proteazlar kullanılarak peptit parçalanması yoluyla gerçekleştirilmektedir (Yates ve ark., 2009). LC-ESI-MS yöntemi oldukça hassas ve yüksek verim sağlayan bir yöntemdir (Zou ve ark., 2018).

Bakteriyosinlerin Biyokoruma Amacıyla Gıdalarda Kullanımı

Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra doğal, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları, farklı uygulamalarda kullanılabilirlikleri açısından oldukça önemlidir. Gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımı, gıda kaynaklı patojenlerin kontaminasyon riskinin azaltılması, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılması, gıdaların raf ömrünün uzatılması, gıdaların organoleptik özelliklerinin korunması, kimyasal koruyucuların kullanımının azaltılması, sanayi ve tüketici taleplerinin karşılanması gibi çeşitli yararlar sağlamaktadır (Katiyar & Jain, 2018). Bakteriyosinler peptit yapıya sahip olmaları nedeniyle proteolitik enzimler tarafından parçalanabilmekte ve insan vücudunda sindirilebilmektedir. Ayrıca, bazı bakteriyosinlerin ısı stabiliteilerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (Verma ve ark., 2022). Bu nedenle, gıda güvenilirliği ve kalitesini sağlamak amacıyla bakteriyosinlerin kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılması gıda endüstrisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bakteriyosinlerin Et ve Et Ürünlerinde Kullanımı

Et ve et ürünleri protein, yağ, esansiyel amino asitler, vitaminler, mineraller ve diğer fonksiyonel besin maddeleri açısından zengin kaynaklar olmasının yanı sıra sahip olduğu su aktivitesi ve pH değeri ile birçok mikroorganizmanın gelişimi için uygun bir ortam sunmaktadır (Manea ve ark., 2017). Son yıllarda tüm Dünya’da artış gösteren gıda kaynaklı hastalık vakalarında et ve et ürünlerinin önemli bir yer tuttuğu ve bu ürün grubunda *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. gibi patojenlerin hastalıklardan sorumlu mikroorganizmalar olarak ön plana çıktığı bildirilmektedir (CDC, 2023). Bununla birlikte, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Brochothrix*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve LAB’leri gibi çok sayıda mikroorganizma ette bozulmalara neden olmaktadır (Sperber, 2009). Taze etler soğukta depolandığı için, bu ürünlerde mikrobiyal bozulmadan sorumlu baskın grup psikrotrof bakterilerdir. Aerobik koşullarda etlerde genellikle yüzeyde yapışkanlık, renk değişimi, kötü koku ve tat oluşumu şeklinde bozulmalar meydana gelmektedir.

Kısa jenerasyon süresine sahip olan *Pseudomonas* türleri parça etlerde glikozu ve amino asitleri kullanarak hızla çoğalmakta ve kötü koku oluşumuna neden olmaktadır. Vakum paketlenmiş etlerde psikrotrof fakültatif anaerobik ve anaerobik bakteriler bozulmalara yol açmaktadır. Vakum paketlenmiş sosislerde heterofermentatif LAB’leri ekşime, CO₂ oluşumu, yüzeyde yapışkanlık ve yeşil renk oluşumuna neden olmaktadır. Modifiye atmosferde paketlenmiş etler ise özellikle fakültatif anaerobik *Brochothrix thermosphacta*’nın üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır (Cervený ve ark., 2009). Kullanılan kimyasal maddelerin güvenliği konusundaki tüketici endişelerinin artmasıyla birlikte et ve et ürünlerinde mikroorganizmaların inaktivasyonunun sağlanmasında, toksik etki göstermeyen ve çevre dostu alternatif koruyucu maddelerin araştırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır.

Et ve et ürünlerinin güvenliğinin sağlanması ve raf ömrünün artırılması amacıyla sentetik maddelere alternatif olarak bakteriyosinlerin kullanımına yönelik çalışmalar artış göstermiştir (Çizelge 12). Castro ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. innocua* (10⁹ kob/mL) inoküle edilen tüketime hazır geleneksel Portekiz sosisi örnekleri *P. acidilactici* tarafından üretilen bakteriyosin bacHA-6111-2 (6400 AU/mL) ile işlem gördükten sonra vakum paketlenme yapılarak 4°C’de 60 gün depolanmıştır. Depolanmanın sonunda *L. innocua* sayısının 2.5 log kob/g azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, 10⁵ kob/mL düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilen tüketime hazır dilimlenmiş Bologna sosisi örnekleri 25 µg/mL nisn ile işlem görmüş ve örnekler 4°C’de 7 gün depolanmıştır. Depolanmanın sonunda nisn ile işlem gören örneklerdeki *L. monocytogenes* sayılarında kontrol örneğine kıyasla farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Churklam ve ark., 2020). Smaoui ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, tavuk göğsü ve kıyma örnekleri *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin TN635 (500 ve 1000 AU/g) ile işlem görmüş ve 4°C’de 28 gün depolanmıştır. Depolanmanın 14. gününde tavuk ve kıyma örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), toplam psikrofilik aerobik bakteri (TPAB) ve Enterobacteriaceae sayıları sırasıyla 2.62-3.92 log kob/g, 2.30-3.71 log kob/g ve 1.91-2.22 log kob/g aralığında azalırken, depolanmanın 21. ve 28. günlerinde örneklerin TMAB, TPAB ve Enterobacteriaceae sayılarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar, bakteriyosinlerin et ve et ürünlerinin güvenilirliğinin sağlanması ve kalitesinin korunması için önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Bakteriyosinlerin Süt ve Süt Ürünlerinde Kullanımı

Çiğ süt içerdiği protein, vitamin ve mineral gibi zengin besin maddelerinin yanı sıra, yüksek pH ve su aktivitesine sahip olması nedeniyle mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam sağlamaktadır (Shabbir ve ark., 2020). Süte uygulanan ısı işlemleri ile mikroorganizma inaktivasyonu sağlanmakta, ancak, çiğ sütün pastörizasyonu sırasında bazı *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* ve *Clostridium* türlerini de içeren termodürük bakteriler canlı kalabilmektedir. Ayrıca, pastörizasyon işleminden sonra koliform grubu bakteriler, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* ve *Pseudomonas* türleri canlı kalabilmektedir.

Çizelge 12. Bakteriyosinlerin gıdaların güvenilirlik ve kalitesi üzerine etkisi

Table 12. Effect of bacteriocins on food safety and quality

Bakteriyosin	Üretici mikroorganizma	Gıda örnekleri	Uygulama koşulları	İncelenen ürün özellikleri	Kaynaklar
Bakteriyosin NX371	<i>Lactobacillus helveticus</i> NX371	Mozzarella peyniri	25°C'de 7 gün depolama 35°C'de 7 gün depolama	Depolamanın sonunda <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis ve <i>Staphylococcus aureus</i> sayıları kontrol örneğine kıyasla yaklaşık 7,0, 6,0, 6,0 ve 7,0 log kob/g azalmıştır.	Meng ve ark., 2021
Nisin (25 µg/mL)	<i>Lactococcus lactis</i>	Bologna sosisi	4°C'de 7 gün depolama	Depolamanın sonunda <i>Listeria monocytogenes</i> sayısında kontrol örneğine kıyasla farklılık tespit edilmemiştir.	Churklam ve ark., 2020
Bakteriyosin PFC339, PFC340 ve PFC341 (100 AU/mL)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PFC339 <i>Enterococcus faecalis</i> PFC340 <i>Lactococcus lactis</i> PFC341	Pastörize süt	4°C'de 7 gün depolama	Depolamanın sonunda süt örneklerinin <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> sayılarının sırasıyla 1,5, 3,0 ve 2,0 log kob/mL azaldığı tespit edilmiştir.	Kaya & Simsek, 2019
Bakteriyosin Cys5-4 (128 AU/mL)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Cys5-4	Fermente chicha suyu	4°C'de 5 gün depolama	Bakteriyosin uygulaması ile <i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella enterica</i> sayıları sırasıyla 3,54 ve 1,31 log kob/mL azalmıştır.	Tenea & Barrigas, 2018
Bakteriyosin Cys5-4 (128 AU/mL)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Cys5-4	Fermente portakal suyu	25°C'de 5 gün depolama	Bakteriyosin uygulaması ile <i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella enterica</i> sayıları sırasıyla 3,63 ve 1,76 log kob/mL azalmıştır.	Tenea & Barrigas, 2018
Bakteriyosin DM33	<i>Enterococcus faecium</i> DM33	Taze peynir	4°C'de 9 gün depolama	Depolamanın sonunda <i>Listeria monocytogenes</i> sayısının tespit edilebilir limitin altına düştüğü tespit edilmiştir.	Aspri ve ark., 2017
Bakteriyosin bacHA-6111-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Portekiz sosisi	4°C'de 60 gün depolama	Depolamanın sonunda <i>Listeria innocua</i> sayısının 2,5 log kob/g azaldığı tespit edilmiştir.	Castro ve ark., 2017
Enterocin L3B1K3 (134, 268 ve 536 µg/g)	<i>Enterococcus faecalis</i> L3B1K3	Taze peynir	4°C'de 3 gün depolama	Depolamanın 3. gününde 134 ve 268 µg/g enterocin ilave edilen örneklerin <i>Listeria monocytogenes</i> sayıları sırasıyla 1,0 ve 3,0 log kob/g azalırken, 536 µg/g enterocin ilave edilen örneklerin <i>Listeria monocytogenes</i> sayısı tespit edilebilir limitin altına düşmüştür.	Ribeiro ve ark., 2017
Bakteriyosin LA343 (100 µg/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDC 343	Fuji elması	25°C'de 20 gün depolama	<i>Staphylococcus aureus</i> sayısının 2,1 log kob/g azaldığı belirlenmiştir.	Bhatia ve ark., 2016
Bakteriyosin LA343 (100 µg/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDC 343	Fuji elması	25°C'de 20 gün depolama	TMAB ve küf-maya sayıları sırasıyla 2,6 ve 3,4 log kob/g azalmıştır.	Bhatia ve ark., 2016
Nisin (0,25 ve 0,50 mg/L)	<i>Lactococcus lactis</i>	UHT süt	6°C'de 21 gün depolama	Nisin uygulaması ile <i>Bacillus cereus</i> sayısı yaklaşık 2 log kob/mL azalmıştır.	Martinez ve ark., 2016
Nisin (0,5 ve 1 mg/L)	<i>Lactococcus lactis</i>	UHT süt	6°C'de 21 gün depolama	Nisin uygulaması ile <i>Listeria monocytogenes</i> sayısı yaklaşık 1,5-3,0 log kob/mL aralığında azalmıştır	Martinez ve ark., 2016
Lacticin 481 (40000 AU/mg)	<i>Lactococcus lactis</i> L3A21M1	Pico peyniri	4°C'de 7 gün depolama	Bakteriyosin uygulaması ile <i>Listeria monocytogenes</i> sayısı yaklaşık 3,0 log kob/g azalmıştır.	Ribeiro ve ark., 2016
Nisin (100, 200, 300, 400 ve 500 IU/mL)	<i>Lactococcus lactis</i>	Minas peyniri	4°C'de 30 gün depolama	<i>Staphylococcus aureus</i> sayısının kontrole kıyasla istatistiksel açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir	Felicio ve ark., 2015
Nisin (400 IU/mL)	<i>Lactococcus lactis</i>	MAP ile paketlenmiş marul örnekleri	10°C'de 6 gün depolama	<i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>Salmonella</i> Typhimurium sayılarının sırasıyla 1,8 ve 1,0 log kob/g azaldığı tespit edilmiştir.	Oliveira ve ark., 2015
Bakteriyosin TN635 (500 ve 1000 AU/g)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Tavuk göğsü, Kıyma	4°C'de 24 saat depolama	Depolamanın 7. saatinde <i>Listeria monocytogenes</i> sayısı tespit edilebilir limitin altında belirlenmiştir.	Smaoui ve ark., 2014

Peynir ürünlerinde *Alcaligenes* ve *Pseudomonas* türleri sıklıkla yüzeyde yapışkanlık oluşumu ile birlikte pürit kokuya neden olmaktadır. Vakum paketlenmiş peynir ürünlerinde gaz oluşumu koliform grubu bakteriler, bazı *Leuconostoc* ve *Clostridium* türlerinin gelişimi sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Monilia*, *Mucor* ve *Penicillium* cinslerine ait bazı türler peynirlerde küflenmelere neden olmaktadır (Lu & Wang, 2017). Bununla birlikte, peynirlerde *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi patojen mikroorganizmaların hastalıklardan sorumlu mikroorganizmalar olarak ön plana çıktığı bildirilmektedir (CDC, 2023).

Süt ve süt ürünlerine mikroorganizmaların bulaşmasının önlenmesi veya gelişimlerinin engellenmesi amacıyla bakteriyosinlerin kullanım potansiyeli çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Çizelge 12). Ribeiro ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, süte 10^5 kob/mL düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilmiş ve kontamine süt kullanılarak taze peynir üretilmiştir. Üretilen peynir örneklerine 134, 268 ve 536 µg/g oranlarında *E. faecalis* tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış enterocin L3B1K3 ilave edilmiş ve peynirler 4°C'de 3 gün depolanmıştır. Depolamanın 3. gününde 134 ve 268 µg/g oranlarında enterocin ilave edilen örneklerin *L. monocytogenes* sayıları sırasıyla 1.0 ve 3.0 log kob/g azalırken, 536 µg/g enterocin ilave edilen örneğin *L. monocytogenes* sayısının tespit limitlerinin altında olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, süt örneklerine 5×10^5 kob/mL düzeyinde *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* inoküle edilmiştir. *B. cereus* inoküle edilen süt örneklerine *L. plantarum* PFC339 tarafından üretilen bakteriyosin PFC339 (100 AU/mL), *L. monocytogenes* inoküle edilen örneklere *E. faecalis* PFC340 tarafından üretilen bakteriyosin PFC340 (100 AU/mL), *S. aureus* inoküle edilen örneklere *L. lactis* PFC341 tarafından üretilen bakteriyosin PFC341 (100 AU/mL) ilave edilmiş ve örnekler 4°C'de 7 gün depolanmıştır. Depolamanın sonunda süt örneklerinin *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* sayılarının sırasıyla 1.5, 3.0 ve 2.0 log kob/mL azaldığı tespit edilmiştir (Kaya & Simsek, 2019). Verma ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. pentosaceus* tarafından üretilen pediocin NCDC 273 (%10) çığ manda sütüne ilave edilmiş ve örnekler 4°C'de 6 saat depolanmıştır. Depolamanın sonunda, örneklerin TMAB, *S. aureus*, LAB'leri, Enterobacteriaceae ve küf-maya sayılarının sırasıyla yaklaşık 6.5, 7.5, 6.5, 7.0 ve 2.5 log kob/mL azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, yüzeyine *Lactobacillus* sp. tarafından üretilen bakteriyosin 100 püskürtülen Camembert peyniri örnekleri 4°C'de 40 gün depolanmış ve örneklerin küf-maya sayılarının 0.66-1.63 log kob/g aralığında azaldığı belirlenmiştir (Khider & Elbanna, 2017). Bu çalışmalar, bakteriyosinlerin süt ve süt ürünlerinde kullanımının kimyasal koruyucu maddelerin kullanımını azaltarak, tüketici taleplerinin karşılanmasına olanak sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Bakteriyosinlerin Meyve ve Sebzelerde Kullanımı

Yüksek karbonhidrat içeriğine ve düşük pH değerine sahip olan meyve ve sebzeler, selüloz ve hemiselüloz gibi diyet lifleri açısından zengin kaynaklar olması nedeniyle beslenme açısından oldukça önemli gıdalardır. Taze olarak

tüketilen meyve ve sebzeler, genellikle açık alanda yetiştirilmekte ve toprak, lağım, sulama suyu, hayvanlar, personel gibi çeşitli kaynaklardan kontamine olabilmektedir (Praeger ve ark., 2018). Ayrıca, hasat sonrası hazırlık, yıkama ve dağıtım sırasında da bu ürünler farklı mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir (Machado-Moreira ve ark., 2019). Dolayısıyla, meyve ve sebzeler, gıda kaynaklı hastalıklara yol açan ve gıda taşıyıcıları olarak kabul edilmektedir. Meyve ve sebzelerin tüketimiyle ilişkili hastalıklarda genellikle *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* türlerinin rol oynadığı bildirilmiştir (CDC, 2023). Bununla birlikte, taze meyve ve sebzelerde mikrobiyal bozulmaya genellikle küfler ve mayalar neden olmakta, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* gibi bazı bakteri türleri de bozulmalara yol açmaktadır (Barth ve ark., 2009). *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Penicillium* ve *Rhizopus* cinslerine ait çeşitli küfler ve *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* ve *Torulopsis* cinslerine ait çeşitli mayalar meyve ve sebzelerde siyah çürüme, gri çürüme, pembe çürüme, yumuşak çürüme ve sap çürümesi gibi bozulmalara neden olmaktadır (Raybaudi-Massilia ve ark., 2009). Dolayısıyla, meyve ve sebze tüketimine bağlı hastalıkların önlenmesi ve bu ürünlerin raf ömrünün uzatılarak gıda israfının önüne geçilebilmesi için mikrobiyal güvenilirlik ve kalitenin sağlanması gıda endüstrisinde önem arz etmektedir.

Meyve ve sebzelerin güvenilirliğinin sağlanması ve kalitesinin artırılması amacıyla sentetik maddelere alternatif olarak doğal, geniş antimikrobiyal spektruma sahip, toksik etki göstermeyen ve genel olarak güvenli statüsünde bulunan bakteriyosinlerin kullanımına yönelik çalışmalar artış göstermiştir (Çizelge 12). Bhatia ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, fuji elması örnekleri *L. acidophilus* tarafından üretilen bakteriyosin LA343 (100 µg/mL) ile işlem görmüş ve örnekler 25°C'de 20 gün depolanmıştır. Depolamanın sonunda TMAB ve küf-maya sayıları sırasıyla 2.6 ve 3.4 log kob/g azalmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada, *L. monocytogenes* bulaştırılan (10^3 kob/g) marul örnekleri 400 IU/mL nisin ile işlem gördükten sonra modifiye atmosferde paketlenmiştir. 10°C'de 6 günlük depolamanın ardından, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* sayılarının sırasıyla 1.8 ve 1.0 log kob/g azaldığı tespit edilmiştir (Oliveira ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile inoküle edilen (10^6 kob/mL) marul örnekleri, *L. lactis* suşu tarafından üretilen nisin ile hazırlanan yıkama sıvısı ile işlem görmüş ve 4°C'de 7 gün depolanmıştır. Depolama sonunda *L. monocytogenes* sayılarının 1.2-1.6 log kob/g aralığında azaldığı tespit edilmiştir (Allende ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar meyve ve sebzelerin güvenilirliğinin sağlanması ve kalitesinin artırılması amacıyla bakteriyosinlerin kimyasal koruyuculara karşı iyi bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç

Son yıllarda gıdalarda koruyucu olarak kullanılan kimyasal maddelerin sağlığa zararlı etkilerinin ortaya çıkması ile tüketiciler tarafından tercih edilmemesi, sağlığa olumsuz etkileri olmayan, daha güvenli ve yüksek

antimikrobiyal etkiye sahip kaynakları araştırmanın gerekliliğini ortaya koymuştur. Kimyasal koruyuculara alternatif olarak LAB'leri tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin tespit edilmesi ve gıdalarda kullanım potansiyellerinin incelenmesi gıda endüstrisi açısından önem arz eden bir konudur. Nisin ve pediocin günümüzde ticari olarak kullanılan bakteriyosinler olmakla birlikte, gıda endüstrisine farklı bakteriyosinlerin kazandırılması önemli bir husustur. Saflaştırılma aşamalarında geri kazanım veriminin düşük olması bakteriyosinlerin ticari olarak üretimlerini sınırlamaktadır. Bu nedenle, bakteriyosinlerin uygun yöntemler kullanılarak saflaştırılması ve yüksek verimde bakteriyosin üretiminin sağlanmasına yönelik çalışmalar yapılması oldukça önemlidir. Ayrıca, bakteriyosinlerin gıda güvenilirliği ve kalitesi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmalar olmasına karşın, bu yönde yapılan çalışmaların artırılması gerektiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abanoz, H. S., & Kunduhoglu, B. (2018). Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5), 1064. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e40>
- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Rsc Advances*, 7(47), 29395-29420. <https://doi.org/10.1039/C6RA24579J>
- Abeer Mohammed, A. B., Al-Saman, M. A., & Tayel, A. A. (2017). Antibacterial activity of fusion from biosynthesized acidocin/silver nanoparticles and its application for eggshell decontamination. *Journal of Basic Microbiology*, 57(9), 744-751. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700192>
- Abo-Amer, A. E. (2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61, 445-452. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0157-6>
- Acedo, J. Z., van Belkum, M. J., Lohans, C. T., McKay, R. T., Miskolzie, M., & Vederas, J. C. (2015). Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), 2910-2918. <https://doi.org/10.1128/AEM.04265-14>
- Aguilar-Galvez, A., Guillermo, S., Dubois-Dauphin, R., Campos, D., & Thonart, P. (2011). The influence of growth conditions on enterocin-like production by *Enterococcus faecium* CWBI-B1430 and *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431 isolates from artisanal Peruvian cheeses. *Annals of Microbiology*, 61(4), 955-964. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0219-4>
- Ahn, H., Kim, J., Kim, & W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control*, 80, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022>
- Allende, A., Martínez, B., Selma, V., Gil, M. I., Suárez, J. E., & Rodríguez, A. (2007). Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, 24(7-8), 759-766. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.002>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Amso, Z., Bisset, S. W., Yang, S. H., Harris, P. W., Wright, T. H., Navo, C. D., Patchett, M. L., Norris, G. E., Brimble, M. A. (2018). Total chemical synthesis of glycocin F and analogues: S-glycosylation confers improved antimicrobial activity. *Chemical Science*, 9(6), 1686-1691. <https://doi.org/10.1039/c7sc04383j>
- Aspri, M., O'Connor, P. M., Field, D., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C., & Papademas, P. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.008>
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Banerjee, S. P., Dora, K. C., & Chowdhury, S. (2013). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish: Bacteriocin from *Lb. brevis* FPTLB3. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 17-25. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0240-4>
- Bangar, S. P., Chaudhary, V., Singh, T. P., & Özogul, F. (2022). Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience*, 46, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101607>
- Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., & Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruits and vegetables. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. In: Sperber WH, Doyle MP (editors) Springer, pp. 135-183.
- Bhatia, A., Rani, P., & Kaur, C. (2016). Application of bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* for shelf life enhancement of fuji apples. *International Journal of Scientific Engineering Research*, 7(10), 775-792.
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., Link, A. J., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistrui. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1273-1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817352116>
- Britton, A. P., van der Ende, S. R., van Belkum, M. J., & Martin-Visscher, L. A. (2020). The membrane topology of immunity proteins for the two-peptide bacteriocins carnobacteriocin XY, lactococcin G, and lactococcin MN shows structural diversity. *Microbiology Open*, 9(1), e00957. <https://doi.org/10.1002/mbo3.957>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in enzymology*, Academic Press, pp. 151-159.
- Castro, S. M., Kolomeytseva, M., Casquete, R., Silva, J., Queirós, R., Saraiva, J. A., & Teixeira, P. (2017). Biopreservation strategies in combination with mild high pressure treatments in traditional Portuguese ready-to-eat meat sausage. *Food Bioscience*, 19, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.008>
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 494-501. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>
- CDC. (2023). List of Multistate Foodborne Outbreak Notices. <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/outbreaks-list.html> (Accessed: 31 August 2023)
- Cervený, J., Meyer, J. D., & Hall, P. A. (2009). Microbiological spoilage of meat and poultry products. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. In: Sperber WH, Doyle MP (editors) Springer, pp. 69-86.
- Chen, Y., Simmonds, R. S., Sloan, G. L., & Timkovich, R. (2008). The metal binding site of zocin A. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13, 855-860. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0371-x>

- Chen, Y. S., Wu, H. C., Kuo, C. Y., Chen, Y. W., Ho, S., & Yanagida, F. (2018). Leucocin C-607, a novel bacteriocin from the multiple-bacteriocin-producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* 607 isolated from persimmon. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 148-156. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9359-6>
- Choi, G. H., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2023). Diversity of the bacteriocins, their classification and potential applications in combat of antibiotic resistant and clinically relevant pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(5), 578-597. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2090227>
- Churklam, W., Chaturongakul, S., Ngamwongsatit, B., & Aunpad, R. (2020). The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage. *Food Control*, 108, 106864. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106864>
- Cogan, T. M., & Hill, C. (1993). Cheese starter cultures, Physics and Microbiology. In: Fox PF (editor) London: Chapman & Hall.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., & Cui, H. (2012). Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16668-16707. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>
- da Costa, R. J., Voloski, F. L., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentin, Â. M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>
- da Silva Sabo, S., Converti, A., Todorov, S. D., Domínguez, J. M., & de Souza Oliveira, R. P. (2015). Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(4), 864-870. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12711>
- Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. (2022). Beyond biopreservatives, bacteriocins biotechnological applications: History, current status, and promising potentials. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102248. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2021.102248>
- Danial, E. N., Al-Zahrani, S. H. M., & Al-Mahmoudi, Z. A. H. M. (2016). Enhancement of novel extracellular bacteriocin production by media optimization using LAB isolate from meat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(12), 20-27. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.601203>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizadeh Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Emamie, A. D., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- Davami, F., Baldi, L., Rajendra, Y., & Wurm, F. M. (2014). Peptone supplementation of culture medium has variable effects on the productivity of CHO cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(3), 146.
- De Giani, A., Bovio, F., Forcella, M., Fusi, P., Sello, G., & Di Gennaro, P. (2019). Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Express*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0813-6>
- Dimov, S., Peykov, S., Raykova, D., & Ivanova, P. (2008). Influence of diverse sugars on BLIS production by three different *Enterococcus* strains. *Trakia Journal of Sciences*, 6(1), 54-59.
- Du, R., Ping, W., & Ge, J. (2022). Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* HDX-2. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112451>
- Fathizadeh, H., Saffari, M., Esmaili, D., Moniri, R., & Mahabadi, J. A. (2021). Anticancer effect of enterocin A-colicin E1 fusion peptide on the gastric cancer cell. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1443-1451. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09770-y>
- Felicio, B. A., Pinto, M. S., Oliveira, F. S., Lempk, M. W., Pires, A. C. S., & Lelis, C. A. (2015). Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4364-4369. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9520>
- Flühe, L., Knappe, T. A., Gattner, M. J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U., & Marahiel, M. A. (2012). The radical SAM enzyme AlBA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nature Chemical Biology*, 8(4), 350-357. <https://doi.org/10.1038/nchembio.798>
- Fu, Y., Zhao, D., Wang, L., Jiang, G., & Liu, X. (2022). A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* in Nanjing Steamed Roast Duck: Purification, antimicrobial characteristics, and antibacterial mechanisms. *Food Bioscience*, 50, 101995. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101995>
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Hernández, P. E., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 2908-2915. <https://doi.org/10.1128/AAC.00314-12>
- Galvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Natural antimicrobials for food biopreservation. Food Biopreservation, New York: Springer.
- Gao, Y., Li, D., Liu, S., & Zhang, L. (2015). Garvicin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* isolated from traditional Chinese fermented cucumber. *Food Control*, 50, 896-900. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.040>
- García-Toledo, J. A., Torrestiana-Sánchez, B., Martínez-Sánchez, C. E., Tejero-Andrade, J. M., García-Bórquez, A., & Mendoza-García, P. G. (2019). Nanoencapsulation of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV26 by microfluidization. *Food and Bioprocess Technology*, 12(1), 88-97. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2184-4>
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *Amb Express*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>
- Ge, J., Kang, J., & Ping, W. (2019). Effect of acetic acid on bacteriocin production by gram-positive. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1341-1348. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05060>
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2015). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262-1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Goyal, C., Malik, R. K., & Pradhan, D. (2018). Purification and characterization of a broad spectrum bacteriocin produced by a selected *Lactococcus lactis* strain 63 isolated from Indian dairy products. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3683-3692. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3298-4>
- Grande Burgos, M. J., Perez Pulido, R., Lopez Aguayo, M. D. C., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706-22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>

- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coilbacille. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Filiales*, 93, 1040-1041.
- Güllüce, M., Karadayı, M., & Barış, Ö. (2013). Bacteriocins: promising natural antimicrobials. *Local Environment*, 3(6), 1016-1027. <https://doi.org/10.13140/2.1.5014.5606>
- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., Kruijff, B. D., & Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637. <https://doi.org/10.1126/science.1129818>
- Heidari, Z., Ghasemi, M. F., & Modiri, L. (2022). Antimicrobial activity of bacteriocin produced by a new *Latilactobacillus curvatus* sp. LAB-3H isolated from traditional yogurt. *Archives of Microbiology*, 204(1), 101. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02641-8>
- Heng, N. C., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 45-92.
- Hwanhlem, N., Chobert, J. M., & Aran, H. (2014). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. *Food Control*, 41, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.021>
- İncili, G. K., Karatepe, P., Akgöl, M., Güngören, A., Koluman, A., İlhak, O. İ., Kanmaz, H., Kaya, B., & Hayaloğlu, A. A. (2022). Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation *in-vitro* antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. *Food Microbiology*, 104, 104001. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104001>
- Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-12>
- Jawan, R., Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Kapri, M. R., Mustafa, S., Halim, M., & Ariff, A. B. (2021). Evaluation of the estimation capability of response surface methodology and artificial neural network for the optimization of bacteriocin-like inhibitory substances production by *Lactococcus lactis* Gh1. *Microorganisms*, 9(3), 579. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030579>
- Jo, D. M., Park, S. K., Khan, F., Kang, M. G., Lee, J. H., & Kim, Y. M. (2021). An approach to extend the shelf life of ribbonfish fillet using lactic acid bacteria cell-free culture supernatant. *Food Control*, 123, 107731. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107731>
- Juárez Tomás, M. S., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. F. (2010). Optimization of low-cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 2-11. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9037-4>
- Kaktcham, P. M., Kouam, E. M. F., Tientcheu, M. L. T., Temgoua, J. B., Wacher, C., Ngoufack, F. Z., & de Lourdes Pérez-Chabela, M. (2019). Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: Bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium. *LWT-Food Science and Technology*, 107, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.007>
- Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M., & Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1323-1335. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8088-9>
- Katiyar, V., & Jain, A. K. (2018). Biopreservation: Novel Technique Augmenting Shelf Life. Thomas LV, Clarkson MR and Delves-Broughton J (2000). Nisin. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu AS (editor). CRC Press, Boca-Raton, FL., pp. 463-524.
- Kaya, H. I., & Simsek, O. (2019). Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. *LWT-Food Science and Technology*, 115, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108464>
- Khay, E. O., Castro, L. M. P., Bernárdez, P. F., Senhaji, N. S., Idaomar, M., & Abrini, J. (2012). Growth of *Enterococcus durans* E204 producing bacteriocin-like substance in MRS Broth: Description of the growth and quantification of the bacteriocin-like substance. *African Journal of Biotechnology*, 11(3), 659-665. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2945>
- Khider, M., & Elbanna, K. (2017). Extending the shelf life of Camembert cheese via controlling over-ripening by bacteriocin of newly lactic acid bacterial isolate LAB100. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 6, 88-98. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20170602.15>
- Kim, N. N., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2019). Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Food Control*, 98, 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.004>
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2012). Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 606-616. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0631-4>
- Lahiri, D., Chakraborti, S., Jasu, A., Nag, M., Dutta, B., Dash, S., & Ray, R. R. (2020). Production and purification of bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SM 2 strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101845. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101845>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Sarkar, T., & Ray, R. R. (2021). Artificial neural network and response surface methodology-mediated optimization of bacteriocin production by rhizobium leguminosarum. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45, 1509-1517. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01157-6>
- Lee, Y. M., Kim, J. S., & Kim, W. J. (2012). Optimization for the maximum bacteriocin production of *Lactobacillus brevis* DF01 using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 21, 653-659. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0085-2>
- Li, H. W., Xiang, Y. Z., Zhang, M., Jiang, Y. H., Zhang, Y., Liu, Y. Y., Lin, L. B., & Zhang, Q. L. (2021). A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: Isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity. *LWT-Food Science and Technology*, 140, 110826. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110826>
- Lim, E. S. (2015). Purification and characterization of two bacteriocins from *Lactobacillus brevis* BK11 and *Enterococcus faecalis* BK61 showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(5), 703-714.
- Lohans, C. T., & Vederas, J. C. (2014). Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins. *The Journal of Antibiotics*, 67(1), 23-30.
- Lu, M., & Wang, N. S. (2017). Spoilage of milk and dairy products. In *The microbiological quality of food*, Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M (editors), Woodhead Publishing, pp. 151-178.

- Lü, X., Hu, P., Dang, Y., & Liu, B. (2014). Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control*, 43, 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.020>
- Lv, W., Zhang, X., & Cong, W. (2005). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 322-326. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1892-7>
- Ma, J., Yu, W., Hou, J., Han, X., Shao, H., & Liu, Y. (2020). Characterization and production optimization of a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* KLDS 1.0338 and its application in soybean milk biopreservation. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 677-692. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1751656>
- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1727-1750. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12487>
- Mahdi, L., Al Mathkhury, H. J. F., Sana'a, A. K., Rasool, K. H., Zwain, L., Salman, I. M. A., Mahdi, N. Z., Kaabi, S. A. G., & Mahmood, N. N. (2017). Antibacterial activity of *Lactobacillus buchneri* bacteriocin against *Vibrio parahaemolyticus*. *Current Applied Science and Technology*, 17(1), 81-86.
- Mahdy, E. N. D., Al-Zahrani, S. H. M., & Al-Mahmoudi, Z. A. H. M. (2020). Partial purification, characterization and antibacterial activity of bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 10(3), 6-13. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.3.L6-13>
- Mahmood, T., Masud, T., Ali, S., Abbasi, K. S., & Liaquat, M. (2015). Optimization and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus* TLBFT06 isolated from Dahi. *Pakistan Journal Pharmaceutical Science*, 28(2), 549-555.
- Małaczewska, J., & Kaczorek-Lukowska, E. (2021). Nisin-A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides*, 137, 170479. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170479>
- Malheiros, P. S., Sant'Anna, V., Todorov, S. D., & Franco, B. D. (2015). Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 825-834. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140279>
- Manea, L., Buruleanu, L., Rustad, T., Manea, I., & Barascu, E. (2017). Overview on the microbiological quality of some meat products with impact on the food safety and health of people, In 2017 E-Health and Bioengineering Conference (EHB), pp. 105-108.
- Martinez, R. C. R., Alvarenga, V. O., Thomazini, M., Fávaro-Trindade, C. S., & de Souza Sant'Ana, A. (2016). Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M., & Vederas, J. C. (2008). Isolation and characterization of cariocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4756-4763. <https://doi.org/10.1128/AEM.00817-08>
- Mathur, H., Fallico, V., O'Connor, P. M., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). Insights into the mode of action of the sacitibiotic thuricin CD. *Frontiers in Microbiology*, 8, 696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00696>
- Mattick, A. T. R., & Hirsch, A. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 5, 5-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(47\)90004-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(47)90004-4)
- Meng, F., Zhu, X., Zhao, H., Nie, T., Lu, F., Lu, Z., & Lu, Y. (2021). A class III bacteriocin with broad-spectrum antibacterial activity from *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 and its preservation in milk and cheese. *Food Control*, 121, 107597. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107597>
- Mercado, V., & Olmos, J. (2022). Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1151-1169. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09966-w>
- Molloy, E. M., Cotter, P. D., Hill, C., Mitchell, D. A., & Ross, R. P. (2011). Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga. *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), 670-681. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2624>
- Monafathia, N. R. M. (2018). Optimization of bacteriocin production from *Lactobacillus plantarum* IN05 by using response surface methodology. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 15(3), 785-791.
- Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>
- Neera, P. M. M., Ramana, K. V., & Bawa, A. S. (2013). Statistical optimization of bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* in a simple food-grade medium. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(2), 179-187. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12020>
- Niamah, A. K. (2018). Structure, mode of action and application of pediocin natural antimicrobial food preservative: A review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 31(1), 59-69. <https://doi.org/10.33762/bagr.2018.160126>
- Nisa, M., Dar, R. A., Fomda, B. A., & Nazir, R. (2023). Combating food spoilage and pathogenic microbes via bacteriocins: A natural and eco-friendly substitute to antibiotics. *Food Control*, 109710. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109710>
- O'Connor, E., & Shand, R. F. (2002). Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 23-31.
- Oliveira, M., Abadias, M., Colás-Medà, P., Usall, J., & Viñas, I. (2015). Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.015>
- Onwuakor, C. E., Ogbulie, J. N., Braide Wesley, O. T. E., Nwokafor Chibuzo, V., & Uchendu, C. E. (2021). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus fermentum* strain COE20 from fermenting *Pentaclethra macrophylla* benth using response surface methodology. *American Journal of Food Science and Technology*, 9(2), 30-37. <https://doi.org/10.12691/ajfst-9-2-1>
- Onwuakor, C. E., Ogbulie, J. N., Braide, W., Ogbulie, T. E., Nwokafor, C. V., & Uchendu, C. E. (2020). Optimization of culture conditions for enhanced bacteriocin production by *Lactococcus lactis* MT186647 using response surface methodology. *American Journal of Microbiological Research*, 8(4), 110-116. <https://doi.org/10.12691/ajmr-8-4-1>
- Parlindungan, E., Dekiwadia, C., & Jones, O. A. (2021). Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Process Biochemistry*, 107, 18-26.
- Pei, J., Jin, W., Abd El-Aty, A. M., Baranenko, D. A., Gou, X., Zhang, H., Geng, J., Jiang, L., Chen, D., & Yue, T. (2020). Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*, 110, 106923. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106923>

- Peng, Z., Xiong, T., Huang, T., Xu, X., Fan, P., Qiao, B., & Xie, M. (2022). Factors affecting production and effectiveness, performance improvement and mechanisms of action of bacteriocins as food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2100874>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.012>
- Praeger, U., Herppich, W. B., & Hassenberg, K. (2018). Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 318-333. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1169157>
- Qiao, X., Du, R., Wang, Y., Han, Y., & Zhou, Z. (2020). Isolation, characterization and fermentation optimization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium*. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 3173-3181. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00634-9>
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 138-144.
- Rasheed, H. A., Tuoheti, T., Zhang, Y., Azi, F., Tekliye, M., & Dong, M. (2020). Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by bacteriocinogenic *Lactobacillus fermentum* BZ532 isolated from Chinese fermented cereal beverage (Bozai). *LWT-Food Science and Technology*, 124, 109113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109113>
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157-180. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x>
- Ribeiro, S. C., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Stanton, C., & Silva, C. C. (2016). An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lactacin 481. *International Dairy Journal*, 63, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.017>
- Ribeiro, S. C., Ross, R. P., Stanton, C., & Silva, C. C. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1303-1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-031>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rogers, L. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16(5), 321-325. <https://doi.org/10.1128/jb.16.5.321-325.1928>
- Sabo, S. S., Converti, A., Ichiwaki, S., & Oliveira, R. P. (2019). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 87-99. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14881>
- Salman, M., Shahid, M., Sahar, T., Naheed, S., Arif, M., Iqbal, M., & Nazir, A. (2020). Development of regression model for bacteriocin production from local isolate of *Lactobacillus acidophilus* MS1 using Box-Behnken design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101542. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2020.101542>
- Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2009). Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1552-1558. <https://doi.org/10.1128/AEM.02299-08>
- Seo, H. J., & Kang, S. S. (2020). Inhibitory effect of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* on the biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium. *Food Control*, 117, 107361. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107361>
- Shabbir, M. A., Ahmed, H., Maan, A. A., Rehman, A., Afraz, M. T., Iqbal, M. W., Khan, I. M., Amir, R. M., Shraf, W. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Effect of non-thermal processing techniques on pathogenic and spoilage microorganisms of milk and milk products. *Food Science and Technology*, 41, 279-294. <https://doi.org/10.1590/fst.05820>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104-111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Sit, C. S., Lohans, C. T., van Belkum, M. J., Campbell, C. D., Miskolzie, M., & Vederas, J. C. (2012). Substitution of a Conserved Disulfide in the Type IIa Bacteriocin, Leucocin A, with L-Leucine and L-Serine Residues: Effects on Activity and Three-Dimensional Structure. *ChemBioChem*, 13(1), 35-38. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100634>
- Smaoui, S., Elleuch, L., Ben Salah, R., Najah, S., Chakchouk-Mtibaa, A., Sellem, I., Besbes, S., & Mellouli, L. (2014). Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(2), 218-225. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.873144>
- Sonsa-Ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M. L., & Yongsawatdigul, J. (2015). Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. *Food Control*, 54, 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.010>
- Sperber, W. H. (2009). Microbiological spoilage of acidified specialty products. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. In: Sperber WH, Doyle MP (editors) Springer, pp. 285-299.
- Tenea, G. N., & Barrigas, A. (2018). The efficacy of bacteriocin-containing cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* Cys5-4 to control pathogenic bacteria growth in artisanal beverages. *International Food Research Journal*, 25(5), 2031-2037.
- Tenea, G. N., & Lara, M. I. (2019). Antimicrobial compounds produced by *Weissella confusa* Cys2-2 strain inhibit Gram-negative bacteria growth. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 105-111. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1561520>
- Todorov, S. D., Ho, P., Vaz-Velho, M., & Dicks, L. M. T. (2010). Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*, 84(3), 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.053>
- Tosukhowong, A., Zendo, T., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Pumpuang, L., Jaresitthikunchai, J., & Sonomoto, K. (2012). Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1619-1623. <https://doi.org/10.1128/AEM.06891-11>
- Trinetta, V., Rollini, M., & Manzoni, M. (2008). Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochemistry*, 43(11), 1275-1280. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.011>
- Trivedi, D., Jena, P. K., Patel, J. K., & Seshadri, S. (2013). Partial purification and characterization of a bacteriocin DT24 produced by probiotic vaginal *Lactobacillus brevis* DT24 and determination of its anti-uropathogenic *Escherichia coli* potential. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5, 142-151. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9132-4>

- Türk Gıda Kodeksi. (2013). Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm> (Erişim tarihi: 20 Ocak 2021)
- Valledor, S. J. D., Dioso, C. M., Bucheli, J. E. V., Park, Y. J., Suh, D. H., Jung, E. S., Kim, B., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2022). Characterization and safety evaluation of two beneficial, enterocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage. *Food Microbiology*, 102, 103886. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103886>
- Verma, D. K., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Gupta, A. K., Baranwal, D., Patel, A. R., Shah, N., Utama, G. L., Niamah, A. K., Chavez-Gonzalez, M. L., Gallegos, C. F., Aguilar, C. N., & Srivastav, P. P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. *Food Bioscience*, 46, 101594. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594>
- Verma, S. K., Sood, S. K., Saini, R. K., & Saini, N. (2017). Pediocin PA-1 containing fermented cheese whey reduces total viable count of raw buffalo (*Bubalis bubalus*) milk. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.031>
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomedical Chromatography*, 27(11), 1497-1502. <https://doi.org/10.1002/bmc.2948>
- Vijayakumar, P. P., & Muriana, P. M. (2015). A microplate growth inhibition assay for screening bacteriocins against *Listeria monocytogenes* to differentiate their mode-of-action. *Biomolecules*, 5(2), 1178-1194. <https://doi.org/10.3390/biom5021178>
- Wang, G., Song, Q., Huang, S., Wang, Y., Cai, S., Yu, H., Ding, X., Zheng, X., & Zhang, J. (2020). Effect of antimicrobial peptide microcin J25 on growth performance, immune regulation, and intestinal microbiota in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Animals*, 10(2), 345. <https://doi.org/10.3390/ani10020345>
- Wannun, P., Piwat, S., & Teanpaisan, R. (2016). Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179, 572-582. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2014-y>
- Wayah, S. B., & Philip, K. (2018). Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0972-1>
- Winkelströter, L. K., Tulini, F. L., & De Martinis, E. C. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>
- Woo, C., Jung, S., Fugaban, J. I. I., Bucheli, J. E. V., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2021). Bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* ST110LD isolated from organic farm soil, a promising biopreservative. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1226-1239. <https://doi.org/10.1111/jam.15042>
- Wu, J., Zang, M., Wang, S., Zhao, B., Bai, J., Xu, C., Shi, Y., & Qiao, X. (2022). Nisin: From a structural and meat preservation perspective. *Food Microbiology*, 104207. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104207>
- Xiang, Y. Z., Wu, G., Zhang, Y. P., Yang, L. Y., Zhang, Y. M., Zhao, Z. S., Deng, X. Y., & Zhang, Q. L. (2022). Inhibitory effect of a new bacteriocin RSQ04 purified from *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes* and its application on model food systems. *LWT-Food Science and Technology*, 164, 113626. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113626>
- Xu, C., Fu, Y., Liu, F., Liu, Z., Ma, J., Jiang, R., & Hou, J. (2021). Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320. *LWT-Food Science and Technology*, 137, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110338>
- Yates, J. R., Ruse, C. I., & Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
- Ye, P., Wang, J., Liu, M., Li, P., & Gu, Q. (2021). Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* ZFM54. *LWT-Food Science and Technology*, 143, 111125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111125>
- Zendo, T., Eunggruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., & Sonomoto, K. (2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1181-1190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02704.x>
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X., & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>
- Zhang, T., Pan, Y., Li, B., Ou, J., Zhang, J., Chen, Y., Peng, X., & Chen, L. (2013). Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins from metagenome of Chinese traditional fermented foods. *Food Control*, 31(2), 499-507. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.015>
- Zhu, L., Zeng, J., Wang, C., & Wang, J. (2022). Structural basis of pore formation in the mannose phosphotransferase system by pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3), e01992-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-21>
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 781-789. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233>



Carbon Dots and Their Potential Usage in Food Analysis

Eren Küllük^{1,a,*}, Ali Gücükoğlu^{1,b}

¹Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Food Hygiene and Technology, 55200, Samsun, Türkiye
^{*}Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 12.05.2024 Accepted : 12.07.2024</p> <p>Keywords: Carbon dots Fluorescent Food safety Sensor Biocompatibility</p>	<p>Carbon dots (CDs), a novel member of the carbon nanomaterial class, exhibit dimensions smaller than 10 nm, high water solubility, biocompatibility, advanced optical properties, and low toxicity. In addition to these mentioned features, CDs surpass traditional analysis methods and other fluorescent carbon nanomaterials in the early detection of threats to food safety due to their environmentally friendly nature, easy and cost-effective synthesis methods, and straightforward applicability. Research indicates that the use of fluorescent CDs in food analysis enables the sensitive and highly selective detection of analytes. This review explores research on the application of CDs in the detection of residues and contaminants in the context of food safety and their use in food packaging.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2398-2406, 2024

Karbon Noktaları ve Gıda Analizlerinde Potansiyel Kullanımı

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 12.05.2024 Kabul : 12.07.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Floresan Gıda güvenliği Karbon noktalar Sensör Biyo-uyumluluk</p>	<p>Karbon noktalar (KN), boyutları 10 nm'den küçük, suda çözünme özelliği yüksek, biyo-uyumluluğu gelişmiş, geniş optik özelliklere ve düşük toksisiteye sahip, karbon nanomateryal sınıfının yeni bir üyesidir. KN, bahsi geçen özelliklerinin yanında; çevre dostu, kolay ve düşük maliyetli sentez yöntemleri, kolay uygulanabilirliği gibi sebeplerden dolayı gıda güvenliğini alanında erken tespit hususunda geleneksel analiz yöntemleri ve diğer floresan karbon nanomateryaller kullanılarak yapılan analizlere göre bir adım öndedir. Yapılan araştırmalar gıda güvenliği kapsamında yapılan analizlerde floresan KN kullanımının, analitlerin hassas ve yüksek seçicilikte tespit edilebildiğini ortaya koymuştur. Bu derlemede, KN gıda güvenliği kapsamında kalıntı ve kontaminantların tespitinde ve gıda ambalajında kullanılmasına yönelik araştırmalar incelenmiştir.</p>

^a eren.kulluk@gmail.com

^{ID} <https://orcid.org/0009-0002-4134-2106>

^b aligucuk@omu.edu.tr

^{ID} <https://orcid.org/0000-0002-8465-7768>



Giriş

Gıda analizi ve kalite değerlendirilmesi, risklere karşı ön uyarı sağlayıp tüketicileri tağşiş, bozulma ve kontaminasyon tehditlerinden koruyarak gıda güvenliği kontrolünde kilit rol oynamaktadır. Bununla beraber gıda matrisleri, birçok farklı maddeyi bir arada bulunduran ve uygun ön işlemler yapılmadan analiz edilmesi mümkün olmayan karmaşık bir yapıya sahiptir. Spektroskopi, immün testler, kültür ve koloni sayımı, elektrokimyasal, enzimatik, nükleer manyetik rezonans ve kromatografi gibi geleneksel gıda analizi yöntemleri, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip, hassas ve seçici bir iz analizi ortaya koymaktadır. Ancak bu yöntemlerin gerektirdiği spesifik ekipmanlar, kalifiye eleman ve zahmetli numune hazırla süreci gibi sebepler, ciddi gıda güvenliği tehditlerinin önceden uyarımı için gerçek zamanlı izleme amacıyla daha uygulanabilir ve kolay analizlere ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır. Geleneksel analiz metotlarıyla karşılaştırıldığında, floresans bazlı gıda analizi oldukça gelecek vadetmektedir. Bu yöntem kendine özgü bir basitliğe, düşük maliyete ve basit ekipman gereksinimine sahiptir. Organik floresan boyalar, metalik nanopartiküller ve kuantum noktaları klasik floresan nanomateryallerdir. Bununla beraber birtakım dezavantajlara sahiptir, örneğin metalik nanopartiküller, yüksek toksisite ve düşük stabiliteye sahipken, organik boyaların suda çözünürlüğü ve biyo-uyumluluğu düşüktür. Bu noktada yeni floresans sensörlerinin tasarlanması için istenilen floresans özelliklere sahip, yüksek hassasiyete sahip çevre dostu floresans algılama materyallerinin geliştirilmesi gerekliliği karşımıza çıkmaktadır (Luo ve ark., 2020). Floresan karbon nanomateryal sınıfının yeni üyesi karbon noktaları, sahip oldukları güçlü floresan özellikleri, kolay sentez yöntemi ve düşük üretim maliyeti, yüksek biyo-uyumluluk özelliklerinin yanı sıra sensör olarak kullanım alanında potansiyel göstermesi sebebiyle ilgi görmüştür (Qu ve ark., 2018a; Shi ve ark., 2019).

Karbon Noktaları

Karbon noktaları (KN), ilk defa floresan tek duvarlı karbon nanotüplerin elektroforetik analizi (Xu ve ark., 2004), sonrasında grafit tozu ve çimentonun lazer ablasyonu esnasında elde edilmiştir (Sun ve ark., 2006). KN ayrıca karbon nano nokta veya karbon nano parçacıklar/partiküller olarak da isimlendirilmektedir (MP ve ark., 2022). KN, boyutları arttırılıp azaltılabilmekle beraber (Kwon ve ark., 2014), çapları 10 nm'den küçük sıfır boyutlu, yapısal olarak farklı ve yarı küresel nanoparçacıklardan oluşan karbon bazlı nanomateryallerdir (Cui ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Karbon bazlı floresan noktalar genel olarak; grafen kuantum noktalar (GKN), karbon kuantum noktaları (KKN), karbon nano noktalar (KNN) ve karbonize polimer noktalar (KPN) olmak üzere 4 başlıkta sınıflandırılmaktadır (Liu ve ark., 2020; Zhu ve ark., 2015). Karbon noktaları bazlı floresan sensörlerin üretimi veya modifiye edilmesi, doğru ve kesin sonuçlar elde etmek için önem taşımaktadır. Çalışmalarda, sensör üretilirken genel olarak 3 strateji üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlardan ilki KN ve analitin doğrudan etkileşimiyle KN floresans sinyallerinin yoğunluğunda değişimlere sebep olmasıdır.

İkincisi KN'nın sensör özelliklerini arttırmak amacıyla çeşitli maddelerle işlevselleştirilmesidir (Deka ve ark., 2022). KN yüzeyinin işlevselleştirilmesiyle floresans özellikleri de ayarlanabilir hale gelmektedir (Boruah ve Chowdhury, 2020; Gogoi ve ark., 2017). Üçüncü strateji, KN'nın söndürücülerle birleştirilerek kullanılmasıdır. Bazı metal iyonlarının varlığında KN'nın floresansının söndüğünü bildiren çeşitli raporlar bulunmaktadır (Deka ve ark., 2022).

Karbon noktaları bazlı biyosensörlerin çalışma prensipleri genel hatları ile 4 gruba ayrılabilir. 1) direk floresan söndürme/kapatma, 2) direk floresan arttırılması/açma, 3) floresanın geri kazanımı/kapatma-açma, 4) tekrar floresan söndürme/kapatma-açma-kapatma (Shi ve ark., 2019). Floresan söndürme mekanizmaları arasında; statik söndürme, dinamik söndürme, Förster rezonans enerji transferi ya da diğer ismiyle floresan rezonans enerji transferi (FRET), ışıkla indüklenen elektron transferi (PET) ve iç filtre etkisi (IFE) sayılabilir (Qu ve ark., 2018b; Zu ve ark., 2017). Hem statik hem de dinamik söndürme, florofor ve söndürücü arasında bir temas gerektirmektedir. Statik söndürme, KN ve söndürücü arasında floresan olmayan temel durum kompleksinin oluştuğu durumlarda gerçekleşir. Dinamik söndürme ise enerji veya yük aktarımı sebebiyle söndürücü ve KN arasında gerçekleşen çarpışma yolu ile uyarılmış durumun, temel duruma döndüğü bir etki olarak tanımlanabilir (Lakowicz, 2006; Zu ve ark., 2017). Dinamik ve statik söndürmenin aksine, FRET ve IFE spektrumun örtüşmesi ve KN ile söndürücü arasındaki mesafeye bağlıdır. FRET 10 nm'nin altındaki mesafelerde meydana gelirken, IFE için bu değer 20 nm'dir. Floresanın geri kazanımı stratejisi, söndürücü içeren floresan söndürme sistemine hedef eklendikten sonra, KN'nın floresansının geri kazanılmasını ifade eder. Tekrar floresan söndürme stratejisi ise söndürücü, onarıcı ve hedef arasındaki etkileşimlere dayanır. Söndürücü ve onarıcı arasında meydana gelen etkileşim sonucu floresans iyileşir ve hedef ile onarıcı arasındaki etkileşimin daha güçlü olması sebebiyle tekrar söner (Shi ve ark., 2019). PET ise KN ve söndürücü arasında gerçekleşen elektron transferi sürecini ifade etmektedir. Bu süreç sonucunda sırasıyla katyon ve anyon radikalleri oluşmaktadır. PET; oksidatif PET ve redüktif PET olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Redüktif PET, KN'nın elektron reseptörü olarak dönorden elektron almasını ifade ederken, oksidatif PET bu durumun tam zıttıdır (Zu ve ark., 2017).

Gıda Analizlerinde Karbon Noktalarının Kullanımı

Gıdaların metal iyonları, anyonlar, pestisitler, veteriner ilaçlar ve yasaklanmış katkı maddeleri gibi kimyasallarla kontaminasyonu ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır (Shi ve ark., 2019). Bunların yanında, gıdaların bozulmasına işaret olan pH değişiminin kontrol altında olması da gıda güvenliği açısından önemlidir (Yu ve ark., 2022b). Halk sağlığına ilişkin risk değerlendirmesi yapılırken, gıda kalitesi hakkında bilgi alabilmek adına gıda analizi gereklidir. Laboratuvarında gerçekleştirilen rutin gıda analizleri için kullanılan geleneksel yöntemler etkili olsa da gıda güvenliğiyle alakalı karşılaşılabilecek ciddi

durumlarda hızlı, zaman kazandıracak yöntemlere ihtiyaç vardır. Gıda analizinde kullanılan; spektroskopi, immün analiz, kültür ve koloni sayımı, enzimatik, elektrokimyasal, nükleer manyetik rezonans ve kromatografi gibi geleneksel yöntemler, yüksek hassasiyet ve seçicilik gibi özellikler ortaya koysa da uygulanabilmesi için özel cihazlar, kalifiye eleman gereksinimi ve uğraştırıcı bir numune hazırlama sürecinden geçilmesi gibi nedenler gıda güvenliğinin sağlanabilmesi adına daha etkili bir yolun gerekliliğini ortaya koymaktadır. Floresans analizinin, maliyet düşüklüğü, uygulama kolaylığı, hızlıca sonuç vermesi gibi özellikleri sayesinde gıda güvenliği araştırmalarında kullanılabilir olması, bu alanda KN bazlı biyosensörlerin geliştirilmesine sebebiyet vermiştir (Luo ve ark., 2020; Shi ve ark., 2019).

Metal İyonları ve Anyonların Tespitinde Kullanılması

Karbon noktaları ve metal iyonları arasındaki etkileşim, KN'nın floresansının söndürülmesine yol açarak, metal iyonlarının tespitini sağlar (Manzoor ve ark., 2023). 2012 senesinde (Zhou ve ark.) KN ile Hg⁺² tespiti için floresan söndürücü bir nanosensör geliştirilmiştir. KN'nın yüzeyindeki -COOH/-OH ile Hg⁺² arasındaki etkileşimi takiben elektron transferi yoluyla non-radiative rekombinasyonu meydana gelmiş ve 4.2 nM tespit limitli 0-3 µM konsantrasyonunda Hg⁺² tespit edilebilmiştir. Başka metal iyonlarının KN yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla etkileşimi de floresan söndürme veya açma ile sonuçlanabilmektedir (Shi ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada -COOH ve Fe⁺³ arasındaki etkileşimin floresan söndürmeyle sonuçlandığı (Miao ve ark., 2017), başka bir çalışmada da KN ve Ag⁺ arasında yük aktarımına dayalı olarak floresan açma nanosensörü geliştirildiği bildirilmiştir (Qian ve ark., 2014).

Metal iyonlarının miktarını tespit etmek amacıyla geliştirilen KN bazlı sensörler detaylı bir şekilde araştırılmasına karşın, anyon tespiti ile ilgili sayılı araştırma bulunmaktadır (Shi ve ark., 2019). İyodür iyonunun tespiti için Hg⁺² iyonunun kullanılarak KN bazlı sensör elde edilen bir çalışmada, iyodür eklenmesinin, Hg⁺² ve I⁻ arasındaki etkileşimin daha güçlü olması sebebiyle, Hg⁺²'nin söndürdüğü floresanın tekrar kazanılmasıyla sonuçlandığı ortaya konmuştur (Li ve ark., 2015). PO₄⁻³ tespiti için Fe⁺³ kullanılması ve F⁻ tespiti için Al⁺³ kullanılması da, aynı mekanizmayla anyon tespiti yapıldığı sonucunu vermiştir (Sun ve ark., 2016; Xu ve ark., 2015).

Gerçek numunelerle çalışılmadan önce metal iyonlarının seçicilik analizinin yapılması gereklidir (Shi ve ark., 2019). Çünkü farklı türdeki KN bir metal iyonuna karşı diğer metal iyonlarına göre daha seçicidir. Ayrıca bu seçicilik ortamda diğer metal iyonlarının da bulunmasından etkilenmez (Wang ve ark., 2015b; Zhou ve ark., 2015). Örneğin, nehir suyunda yalnızca Cu⁺² varlığı azot katkıları KN'nın floresansını etkili bir şekilde söndürürken, aynı koşullarda Cd⁺², Ba⁺², Hg⁺², Fe⁺², Ag⁺, Ca⁺², Li⁺, Mg⁺², Pb⁺² ve Zn⁺² metal iyonları floresan yoğunluğunda kayda değer bir değişiklik göstermemiştir (Das ve ark., 2017). Bu durumun, KN'nın yüzeylerinde bulunan karboksil, hidroksil ve amino gruplarıyla metal iyonları arasındaki kuvvetli bağlanma affinitesi ve hızlı şelatlanmasından ileri gelmesine bağlanmaktadır (Zhang ve ark., 2016).

Pestisit Kalıntılarının Tespitinde Kullanılması

Yapılan bir çalışmada organofosfat pestisitleri tespit etmek amacıyla, H₂O₂ tarafından Fe⁺²'nin oksitlenmesiyle oluşan Fe⁺³'ün KN floresansını söndürmesi prensibine dayanan bir floresans sensör oluşturulmuştur. Floresanın sönmesi, Fe⁺³ ve KN yüzeyindeki oksijen arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Organofosforlu pestisitler, AChE aktivitesini inhibe ederek H₂O₂ oluşumunu engellemekte, böylece organofosforlu pestisitlerin varlığında, H₂O₂ eksikliğinden dolayı KN floresansını yanmaya devam etmektedir. Böylece KN floresansının pestisit konsantrasyonuyla orantılı olduğu evrensel yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin doğrusal aralığı 0,01–1,0 µg/mL ve tespit limiti 3ng/mL olarak belirlenmiştir (Lin ve ark., 2018). Aynı araştırmacılar elektrokimyasal yol aracılığıyla pestisit kalıntısı tespitini gerçekleştirmiştir. Bu bağlamda KN floresansının AChE kontrolünde söndürülmesine ilkesine dayanan, içeren çift modlu bir tespit yöntemi ortaya konmuştur. Asetiltiyokolin ve AChE reaksiyona girerek tiyokolini oluşturmakta, tiyokolin de sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşturmak üzere 5,5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)'in ayrışmasını tetiklemektedir. Oluşan bu sarı renkli bileşik, KN'nın floresansını dinamik söndürme yoluyla söndürmek için güçlü bir soğurucu/emici olarak görev yapmaktadır. Organofosforlu pestisitlerin varlığında AChE enzim aktivitesi inhibe edilmesi, KN floresansının geri kazanılmasına ve emici/soğurucu yoğunluğundaki azalmayla renk değişimine sebep olmuştur (Li ve ark., 2018).

Antibiyotikler ve Diğer Veteriner İlaç Kalıntılarının Tespitinde Kullanılması

Diğer geleneksel tespit metodlarına kıyasla, KN hazırlanması daha kolay ve daha maliyetsiz olmakla beraber, KN'na dayanan tespit yöntemleri hızlı, yüksek hassasiyetli ve güçlü seçicilik özelliklerine sahiptir. Örneğin tetrasiklin grubu antibiyotiklerin hızlı tespiti için, S ve N katkıları KN'na dayalı floresan bir sensör geliştirilmiştir. İç filtre etkisiyle, tetrasiklinler KN'nın floresansını kapatmaktadır. Optimal şartlar altında, 0.56 µmol/L tespit sınırı, 1.88–60 µmol/L konsantrasyonundaki tetrasiklini tespit edilebilmektedir. Bu sensörle, süt, bal, hatta musluk suyu gibi gerçek numunelerde de tetrasiklin kalıntısı tespit edilebilmektedir (Fan ve ark., 2022). KN'nın sensör olarak kullanımı, yalnızca tetrasiklinleri tespit etmekle kalmayıp, tetrasiklinleri ayırt edebilmek için de kullanılabilir. Tetrasiklin varlığı, KN floresansını iç filtre etkisinden meydana gelen bir floresans kayması olmadan söndürürken, klorotetrasiklin varlığı KN floresansının maviye kaymasına, oksitetrasiklin varlığı ise KN floresansının kırmızıya kaymasına sebep olmuştur (Miao ve ark., 2018). Tetrasiklin ve türevlerinin yanı sıra, KN floresansının söndürülmesi ve açılmasıyla sefaleksinin (Akhgari ve ark., 2017), siprofloksasin (Wang ve ark., 2017), norfloksasin (Hua ve ark., 2018), sülfasalazin (Zhang ve ark., 2018b) de tespit edilebilmektedir (Shi ve ark., 2019).

Antibiyotiklerin yanı sıra gıdalarda, hayvanların canlı ağırlık artışına katkı sağlayan östrojen ilaçlarına da sıklıkla rastlanılmaktadır (Shi ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada süt numunesinde dietilstilbestrol varlığı araştırılmış, dietilstilbestrolün KN floresansını söndürerek tespit edilebildiği ortaya konmuştur (Zhao ve ark., 2018).

β -agonist familyasının bir üyesi olan ve hayvan yemlerinde kullanılması yasadışı olan clenbuterol insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Clenbuterol tespiti için, KN ve altın nanoparçacıklarından oluşan bir FRET sistemi dizayn edilmiştir. Clenbuterol varlığında, clenbuterol molekülleri altın nanoparçacıklarla etkileşime girerek, floresan yoğunluğunun geri kazanılmasına sebep olacak KN altın nanoparçacığı etkileşimini önlemektedir. Bu yöntem sayesinde, domuz eti numunesinde başarıyla clenbuterol tespiti gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2017).

Gıda Kaynaklı Patojenlerin Tespitinde Kullanılması

Çeşitli bakterilerin tespitinde kullanılan geleneksel yöntemlerin zahmetli olması sebebiyle daha pratik ve hassas tespit yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu stratejiler arasında KN'na dayanan açma/söndürme floresan sensörleri, bakterilerin kantitatif belirlenmesinde dikkat çekmektedir. KN'nın arasındaki mesafenin artması veya azalması sebebiyle, bakteriyle karşılaşan KN'nın floresansının artırılıp söndürülmesi farklı bakteri türlerinin tespiti için önem taşımaktadır (Shi ve ark., 2019).

Wang ve ark. (2015a), *S. Typhimurium*'un yüzeyindeki spesifik bir membran proteinini tanıyan, KN-aptamer kompleksine dayalı bir sensör bildirmiştir. Hazırlanan KN-aptamer solüsyonu, *S. Typhimurium* ile 2 saat süreyle 37 °C sıcaklıkta tepkimeye sokularak bakterinin işaretlenmesinden sonra etken konsantrasyonu floresan yoğunluğuna göre ölçülebilmektedir. Benzer yöntemle, *E. coli* konsantrasyonu da mannoz (Lai ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016), kolistin (Chandra ve ark., 2017) ve amikasin (Chandra ve ark., 2016) ile modifiye edilmiş KN kullanılarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, bu stratejiden yola çıkılarak *S. aureus*'un duyarlı tespiti amacıyla, kırılabilir organosilika nano kapsüller ile her bir nano kapsülde yüzlerce KN içeren kapsüllenmiş KN hazırlanmıştır. Bu kapsüller *S. aureus*'u spesifik olarak tanınması amacıyla anti-*S. aureus* antikoruyla konjuge edilerek immünofloresan nano kapsüller haline getirilmiştir. Sonuç olarak sinyal amplifikasyon teknolojisi yardımıyla hassas bir tespit gerçekleştirilmiştir (Yang ve ark., 2018a). Başka bir çalışmada ise, manyetik nanopartiküllerin KN ile birleştirilmesiyle elde edilen manyetik KN, amin gruplarıyla işlevselleştirilerek *E. coli* ve *S. aureus*'un tespitinde kullanılmıştır. Manyetik KN elektrostatik ve Van der Waals kuvveti etkisiyle bakterilerin yüzeyine adsorbe edilmekte, artan bakteri konsantrasyonu sonucu artan floresans sayesinde bakteriler hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir (Bhaisare ve ark., 2016). Yapılan bir çalışma vankomisin ile modifiye edilmiş KN'nın *S. aureus*'un yüzeyinde kümelenmesini ve bu durumun da floresan yoğunluğunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı strateji *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerini tespit etmek amacıyla da uygulanmıştır (Zhong ve ark., 2015). Wang ve ark. (2020), patojen mikroorganizmaların tanımlanması için, KN'nın fotoluminesans emisyon dalga boylarının ayarlanabilir olması özelliğini kullanarak, tek konsantrasyona bağlı KN temelli bir yöntem geliştirmiştir. KN'nın fotoluminesans emisyon dalga boyları, yalnızca KN sentezlenmesi amacıyla hazırlanan öncü maddeleri içeren çözeltinin konsantrasyonunun değiştirilmesiyle ayarlanabilmektedir. Böylece farklı floresans spektrumları kullanılarak; *S.*

aureus, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *M. smegmatis*, *E. coli* O157, *V. parahaemolyticus*, *Salmonella paratyphi* A ve *S. enterica*'nın dahil olduğu 8 farklı mikroorganizma tanımlanmıştır. Bu yöntem *Listeria spp.*'nin alt türlerinin ayırt edilebilmesine de olanak sağlamıştır. Farklı mikroorganizmalar, hücre duvarı geçirgenliği, sitoplazma pH'ı ve içerdikleri metal iyonlarının farklılıkları nedeniyle KN'na farklı bağlanma affiniteleri göstermiş, bu durum da fotoluminesans spektrumun da farklılıklara yol açarak, tek bir tür KN kullanılarak mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca bu çalışma, doğada birden fazla mikroorganizmanın bir arada bulunmasından dolayı, yalnızca saf bakteri kültürleri üzerinde tespit çalışması yapmakla kalmamış, 3 farklı mikroorganizmanın bir arada bulunduğu bir karışım oluşturmuştur. Bu mikroorganizma karışımında da 3 türün birbirinden ayırt edilebildiği bildirilmiştir. Saad ve ark. (2023), gümüş nitrat nanoparçacıklarının, hedef oligonükleotit varlığında KN floresansını söndürmesini temel alan bir sistem oluşturarak, *E. coli* O157:H7 *fliC* geni tespit eden bir sensör oluşturmuştur.

Gıda kaynaklı zararlı mikroorganizmaların yanında, toksinleri tespit etmek amacıyla da KN'nın floresans özelliklerinden yararlanılmıştır (Khan ve ark., 2022). Xu ve ark. (2020), su ve balık numunesinde mikrosistin-LR (MC-LR) tespiti amacıyla fluorescence enzyme-linked immunoassay (FELISA) testi geliştirmiştir. Başka bir çalışmada, Liang ve ark. (2018), yer fıstığı numunesinde aflotoxin-B1 tespiti için KN bazlı bir sensör bildirilmiştir. Yine başka bir çalışmada, KN kullanarak sütte *Staphylococcal enterotoxin A* tespiti için bir sensör üretilmiştir (Veissi ve ark., 2021).

Gıda Katkı Maddeleri ve Bileşenlerinin Tespitinde Kullanılması

Tannik asit (TA) bir gıda katkı maddesi olarak kullanıldığında, içeceklerin ve şarapların lezzetini ve kalitesini olumlu yönde etkilemektedir. Yang ve ark. (2019), beyaz şarapta TA tespiti yapmak amacıyla, yenilenebilir ksilan ve dallanmış polietilenimin (BPEI) içeren bir prekürsörden poliainle işlevselleştirilmiş KN hazırlayarak bir tespit sistemi oluşturmuştur. Bu sistemle, optimum koşullar altında su ve etanol çözeltisinde TA konsantrasyonlarının sırasıyla 0,1–5 μ M aralığında olduğu gözlenmiş ve 36,8 ve 44,9 nM konsantrasyonlarında TA tespiti yapılabildiği gözlenmiştir.

Daha çok C vitamini olarak bilinen askorbik asit, $C_6H_8O_6$ kimyasal formüllü, monosakkarit ailesine ait organik bir bileşiktir. Antioksidan ve stabilizatör özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinden sıklıkla kullanılmaktadır (Varvara ve ark., 2016). Ancak bazı durumlarda aşırı miktarda askorbik asit, gıdada meydana gelen doğal süreçlerin engellenmesine sebep olarak, tat ve aroma üzerinde olumsuz etkiye sahip olabilmektedir (Wawrzyniak ve ark., 2005). Wang ve ark. (2021), askorbik asit tespiti amacıyla, KN ve Fe^{+3} 'e dayanan floresans bir sensör geliştirmiştir. Sensörün çalışma prensibi, KN ve Fe^{+3} 'ün arasındaki etkileşim sonucu KN floresansının söndürülüp, ortama askorbik asit eklendiğinde floresansın geri kazanılmasıyla askorbik asidin tespit edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemle 3.11 μ mol/L konsantrasyona kadar askorbik asit tespiti yapılabilmektedir. Benzer şekilde Ma ve ark. (2019), C

vitaminini hızlıca ve kolayca tespit edebilmek için, aktif karbondan sentezlediği sarı KN temelli bir sensör oluşturmuştur. KN solüsyonuna eklenen Cu^{+2} floresans kapatıcı görev görmekte ve daha sonra aynı solüsyona C vitamininin eklenmesiyle, Cu^{+2} 'nin askorbik asit tarafından Cu^{+} 'ya indirgenmesinden ötürü KN floresansı geri kazanılmıştır. Ayrıca bu sensör sistemi, C vitamini tableti, portakal suyu ve taze portakal üzerinde de test edilerek, gerçek numunelerdeki etkinliği de ispatlanmıştır.

Rodamin 6G (R6G), insan vücuduna zarar verdiği sebebiyle gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmış klasik bir boyadır (Li ve ark., 2023). Buna karşın, düşük maliyeti ve iyi bir gıda renklendiricisi olması sebepleriyle hala gıdalarda yasa dışı kullanımı devam etmektedir (Li ve ark., 2023). Cui ve ark. (2018) RG6 tespiti için, içinde KN gömülü mezo gözenekli organosilika kullanarak, hassas moleküler baskılı floresan sensörü dizayn etmiştir. Sensör, 4 -7 $\mu\text{g/L}$ arasındaki konsantrasyonlardaki RG6'yı hassasiyetle tespit edebilmiştir.

Clenbuterol (Clen), kullanımı çoğu ülkede yasaklanmış olsa da, günümüzde hala hayvan etlerine illegal olarak eklenmektedir (Tian ve ark., 2023). Yao ve ark. (2020), Clen tespiti amacıyla, en düşük tespit limiti 0.68 pg/ml olan bir immüno-sensör geliştirdiğini bildirmiştir.

E102 veya limon sarısı olarak da adlandırılan tartrazin, gıda boyası olarak kullanılan sentetik bir azo boyasıdır. Tartrazinin düşük dozlarda bile karaciğer ve böbrek gibi hayati organlar üzerinde olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir. Yüksek dozlarda ise, serbest radikal oluşumu ile oksidatif stresi indüklemesinden dolayı daha tehlikeli bir hal almaktadır (Amin ve ark., 2010). Yang ve ark. (2020), içeceklerde tartrazin tespiti yapmak amacıyla, N-Cl katkılı KN sentezleyerek 48 nM tespit limitli floresans bir sensör oluşturmuştur. Yaygın olarak kullanılan bir diğer renklendirici karminidir. Yapılan bir çalışmada, karbon kaynağı olarak kurutulmuş limon kabuğunu kullanarak üretilen KN'lere dayalı floresan bir sensör oluşturularak içeceklerde karmin varlığını araştırmış ve başarılı bir sonuç elde edilmiştir (Su ve ark., 2018).

Melamin, $C_3H_6N_6$ moleküler formülüne sahip, %66,6 oranında azot içeren bir triazin bileşimidir. Günümüzde melaminin yüksek azot içeriği sebebiyle, protein içeriğini arttırmak için hala süt ürünlerinde illegal kullanımı devam etmektedir (Li ve ark., 2019). Hu ve ark. (2019), sütte melaminin görsel analizini yapmak amacıyla, altın nanopartiküllerle işlevselleştirilmiş KN sentezlemiştir. Melamin konsantrasyonu artışı, KN'lerin floresans emisyonunun artmasıyla sonuçlanmış olup, tespit limitinin 3.6 nM olduğu bildirilmiştir.

Nitrit tuzları suda ve toprakta doğal olarak bulunmakta olup beslenme yoluyla vücuda alınmaktadır. Bununla beraber gıdaların raf ömrünü uzatmak, antibakteriyel etki, işlenmiş et ürünlerine kırmızı renk vermek amacıyla, sıklıkla gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. (Cancer, 2010). Ancak yapılan araştırmalar nitrit tuzlarının kronik süreçte meme ve prostat kanseri riskini arttırdığını ortaya koymuştur (Chazelas ve ark., 2022). Nitrit tek başına kanserojenik etki göstermese de, pişirilme veya başka koşullar altında, güçlü kanserojenik etkiye sahip N-nitrosamin oluşumuna sebep olmaktadır (Gan ve ark., 2020). Sonuç olarak nitrit içeriğinin doğru, hassas ve seçici tespit edilebilmesi, gıda güvenliği kontrolü açısından önem arz etmektedir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, nitrit

çift modlu tespiti için hem kolorimetrik hem florometrik tespit özelliğine sahip, yeni bir kırmızı emisyon KN floresan probu üretilmiştir. Gül kırmızısı renkteki kırmızı emisyon KN içeren solüsyona eklenen nitrit, KN yüzeyindeki amino gruplarıyla etkileşime girerek, çözelti renginin gül kırmızısından açık mora dönüşmesine sebep olan diazotize bir ürün oluşturmaktadır. Bu sırada kırmızı floresans ise yavaş yavaş söndürülmektedir. Böylece nitrit varlığı hem florometrik yöntemle hem de kolorimetrik yöntemle tespit edilmiş olmaktadır (Yu ve ark., 2022a).

Bazı metal iyonları KN ile etkileşime girerek floresanslarının sönmesine sebep olmaktadır. Ancak birçok besin maddesi metal iyonlarını şelatlama yeteneğine sahiptir. Böylece bazı metal iyonlarını içeren KN çözeltisine besinlerin eklenmesi sonucu KN'nın floresansı tekrar kazanılabilmektedir. Dolayısıyla bu durum, gıdalardaki besin maddelerini tespit etmek amacıyla floresan sensör oluşturmaya olanak sağlamaktadır (Manzoor ve ark., 2023). Örneğin B1 vitamini (Purbia ve Paria, 2016) ve C vitamininin (Fong ve ark., 2016), KN'na aracılık eden metal iyonlarını uzaklaştırarak veya azaltarak floresansı geri kazandırdıkları ortaya konmuştur (Shi ve ark., 2019). B9 vitamini ise farklı bir şekilde, direk olarak KN'nın fonksiyonel gruplarıyla girdiği etkileşim sonucunda floresansı söndürdüğü bildirilmiştir (Chen ve ark., 2016).

İndirgenmiş glutatyon (GSH), bir tür endojen antioksidan ve serbest radikal temizleyicidir. Ancak insan vücudundaki anormal GSH seviyeleri Alzheimer hastalığı, AIDS, kanser ve kalp-damar hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. C vitamini tespitinde belirtilen, Cu^{+2} iyonunun floresans söndürücü özelliğine dayanan stratejiyle GSH tespiti yapıldığı da bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2018a).

Ovalbumin, gıdalarda önemli bir protein kaynağıdır, gıdada bulunma miktarı protein kalitesinin değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmaktadır (Yu ve ark., 2022b). Fu ve ark. (2018), ovalbumin tespiti için, ovalbumin antikoruyla modifiye edilmiş KN ve grafen oksit kullandığı bir sensör sistemi oluşturmuştur. Ovalbumin yokluğunda anti-ovalbumin antikoruyla modifiye edilmiş KN'nın floresansı grafen oksit tarafından söndürülürken, sisteme ovalbumin dahil edildiğinde anti-ovalbumin antikoruyla özel bir bağlanma yapmak üzere grafen oksitle yarışmış, bu durum da floresansın geri kazanılmasıyla sonuçlanmıştır.

Birkaç araştırma da yine metal iyonlarının floresans söndürücü etkisinden ilham alarak, sistemin tespiti amacıyla Hg^{+2} iyonu ve KN'ndan oluşan sensörleri kullandığını bildirmiştir (Yan ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise, KN'nın ayrıca arjinin tespitinde de floresan probolar olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2017).

Gıda Bozulması Tespitinde Kullanılması

Histaminin yoğunluğu gıdalarda bozulmuş gıdalarda artmakta ve gıda güvenliği noktasında indikatör olarak kullanılabilmektedir. Shi ve ark. (2020), balık numunesinde histaminin algılanması için, KN ve sentetik peptitler kullanarak yeni bir hassas ve seçici floresans tespit platformu oluşturmuştur. Bu bağlamda, floresansı peptitler tarafından elektron transferi yoluyla söndürülen KN üretilmiştir. Histamin varlığında, peptit ve histamin arasındaki etkileşimin daha güçlü olması sebebiyle, KN

floresanın geri kazanıldığı görülmüştür. Çalışma, KN ve peptit sensör sisteminin, histaminin düşük konsantrasyonlarında dahi yüksek seçicilik ve hassasiyetle tespit edildiğini ortaya koymuştur (Shi ve ark., 2020). Histamin tespitinde, KN yüzeyindeki aldehit grubu ile histaminin amin grubu arasındaki spesifik etkileşime dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Solvotermal yöntemle mavi ışık yayan KN sentezlenmiş, kırmızı ışık yayan l-aminoantrakinon boyası KN'na entegre edilmesiyyle, histamin konsantrasyonu arttıkça rengin kırmızıdan maviye döndüğü bir yanıt elde edilmiştir (Qin ve ark., 2022).

Bir başka çalışmada, balık jelatin filmi yardımıyla, bir akıllı telefon uygulaması üzerinden gıda bozulmasının kolorimetrik olarak izlenmesi amaçlanmıştır. Balık jelatin filmi UV ışık altında KN ile birleştirilerek, daha gelişmiş özellikte filmler elde edilmesi hedeflenmiştir. Filmlerin amonyak hassasiyetinin test edilmesi amacıyla, amonyak buharına karşı kolorimetrik yanıtları araştırılmış ve en iyi özellikleri UV ışık altında KN ile birleştirilmiş filmlerin sergilediği gözlenmiştir. Daha gerçek numunelerde gıda bozulmasının tespiti denenmiş ve bahsi geçen filmlerin renk değişimlerinin, derisiz tavuk göğüs eti numunelerinde mikrobiyal yoğunluk ve TVB-N salınımlarıyla iyi korelasyon gösterdiği gözlenmiştir (Kilic ve ark., 2022).

Biyojen amin tespiti üzerine yapılan bir başka çalışmada pH'a duyarlı KN ve Rodamin B'nin karıştırılmasıyla sekiz tür biyojen amin için bir 10 saniyede tepki veren floresan sensör oluşturulmuştur. KN ve Rodamin B'den oluşan bir çözelti karışımı içerisinde bir filtre kağıdının yayılmasıyla taşınabilir floresan bir filtre kağıdı elde edilmiş, elde edilen bu floresan filtre kağıdı sensörünün, karides ve mantar numunelerinden elde edilen biyojen aminlerin varlığında bariz bir renk değişimine uğradığı gözlemlenmiştir (Yan ve ark., 2023).

Gıdalarda pH Değeri Tespitinde Kullanılması

Karbon noktalarının, belirli moleküller veya çevresel koşullarla etkileşime yanıt olarak floresans sinyallerinin değişimi de bu yapıların biyosensör olarak kullanımının geliştirilmesi amacıyla incelenmiştir (Khan ve ark., 2022). Bazı yeni çalışmalar, özellikle bazı algılama uygulamalarını genişletmek amacıyla, pH, gaz üretimi, su aktivitesi gibi belirteçleri temsil etmek için KN'nın kullanılmasına yönelik yeni yöntemler geliştirmeyi hedeflemiştir (Ma ve ark., 2021). KN'nın floresansının belirli maddelerle etkileşime girmesi neticesinde değişebilmesi, floresan nanosensörlerin, gıdalar da dahil olmak üzere çeşitli ortamlardaki pH değişikliklerini tespit etmek için geliştirilmesinde kullanılabilir (Moradi ve ark., 2023). Son zamanlardaki bazı çalışmalar KN'nın bu amaca yönelik çalışmasındaki becerisini ortaya koymuştur (Khan ve ark., 2022).

Yang ve ark. (2018b), pH ölçümü amacıyla azot katkılı KN sentezlemiş ve ortam pH'ının 1,5'ten 7,5'e doğru değişim göstermesine paralel olarak floresans yoğunluğunda doğrusal bir azalma gözlemlendiğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada, clitoria ternatea (CTE) bitkisinden elde edilen antosiyanin ve KN birleştirilerek nişasta bazlı akıllı biyopolimer film üretilmiştir. Üretilen filmler, KN ve CTE'nin sinerjistik etkisi nedeniyle en yüksek mekanik, bariyer, antioksidan ve termal özellikleri sergilemesinin yanı sıra, bu filmlerde CTE'nin içerdiği antosiyanin varlığı sebebiyle farklı pH değerlerinde renk

değişimleri göstermiştir. Bu filmler paketlenmiş domuz eti numunesinin tazeliğini ölçmede bir gösterge olarak kullanıldığında, depolama süresi arttıkça renklerin mordan yeşile doğru değiştiği gözlenmiştir (Koshy ve ark., 2021).

Zhang ve ark. (2020), biyojen amin tespiti amacıyla pH'a duyarlı kırmızı emisyon KN hazırlamıştır. Sentezlenen KN, depolama sırasında çürüten karideslerden salınan biyojen aminlerin tespiti için kullanılmıştır. Aynı çalışmada ayrıca, kırmızı emisyon KN ile işlenmiş filtre kağıtlarının, pH 2,5 değerli solüsyona daldırıldığında soluk kırmızı, diğeri ise pH 12 değerli solüsyona daldırıldığında ise koyu kırmızı floresans verdiği gözlemlenmiş ve yapılan bu deney sonucunda pH'a duyarlı kırmızı emisyon KN'nın önemli bir yere sahip olan "sahteciliğe karşı mürekkep" olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç

Karbon noktalar, sahip oldukları düşük toksisite, uygulama kolaylığı, düşük maliyeti, güçlü optik özellikleri gibi özelliklerinden dolayı, gıda güvenliği alanında kullanımı birçok uluslararası araştırmaya konu olmuştur. Ancak ülkemizde karbon noktaların sentezlenmeleri ve özellikleri kendi başına araştırılmış olsa da gıda güvenliğinde kullanımına ait bir çalışma bulunmamaktadır. Karbon noktaların floresan özelliği kullanılarak gıdalarda; ağır metaller, pestisit kalıntıları, antibiyotik ve veteriner ilacı kalıntıları, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti gibi uygulamaların yanı sıra, gıda ambalajına entegre edilerek gıdalarda bozulmayı tespit eden bir sensör olarak kullanımı veya sahip oldukları belirlenen antioksidan, antimikrobiyal özellikler gibi bir dizi sebep dolayısıyla gıda paketlemesinde doğrudan gıda yüzeyini kaplayan kaplamalar olarak kullanımı da geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Akhgari, F., Samadi, N., Farhadi, K., & Akhgari, M. (2017). A green one-pot synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon quantum dots for sensitive and selective detection of cephalixin. *Canadian Journal of Chemistry*, 95(6), 641-648. doi:https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0531
- Amin, K. A., Hameid II, H. A., & Abd Elsttar, A. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.039
- Bhaisare, M. L., Gedda, G., Khan, M. S., & Wu, H.-F. (2016). Fluorimetric detection of pathogenic bacteria using magnetic carbon dots. *Analytica chimica acta*, 920, 63-71. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.025
- Boruah, J. S., & Chowdhury, D. (2020). Palmitic acid-carbon dot hybrid vesicles for absorption of uric acid. *Applied Nanoscience*, 10(7), 2207-2218. Retrieved from https://link.springer.com/article/10.1007/s13204-020-01374-2
- Cancer, I. A. f. R. o. (2010). Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 94. Retrieved from http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/index.php
- Chandra, S., Chowdhuri, A. R., Mahto, T. K., Samui, A., & kumar Sahu, S. (2016). One-step synthesis of amikacin modified fluorescent carbon dots for the detection of Gram-negative bacteria like Escherichia coli. *RSC advances*, 6(76), 72471-72478. doi:https://doi.org/10.1039/C6RA15778E

- Chandra, S., Mahto, T. K., Chowdhuri, A. R., Das, B., & Kumar Sahu, S. (2017). One step synthesis of functionalized carbon dots for the ultrasensitive detection of *Escherichia coli* and iron (III). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245, 835-844. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.017>
- Chazelas, E., Pierre, F., Druésne-Pecollo, N., Esseddik, Y., Szabo de Edelenyi, F., Agaesse, C., . . . Srour, B. (2022). Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. *International journal of epidemiology*, 51(4), 1106-1119. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9365633/pdf/dyac046.pdf>
- Chen, Z., Wang, J., Miao, H., Wang, L., Wu, S., & Yang, X. (2016). Fluorescent carbon dots derived from lactose for assaying folic acid. *Science China Chemistry*, 59, 487-492.
- Cui, C., Lei, J., Yang, L., Shen, B., Wang, L., & Zhang, J. (2018). Carbon-dot-encapsulated molecularly imprinted mesoporous organosilica for fluorescent sensing of rhodamine 6G. *Research on Chemical Intermediates*, 44, 4633-4640.
- Cui, L., Ren, X., Sun, M., Liu, H., & Xia, L. (2021). Carbon Dots: Synthesis, Properties and Applications. *Nanomaterials*, 11(12), 3419.
- Das, P., Ganguly, S., Bose, M., Mondal, S., Das, A. K., Banerjee, S., & Das, N. C. (2017). A simplistic approach to green future with eco-friendly luminescent carbon dots and their application to fluorescent nano-sensor 'turn-off' probe for selective sensing of copper ions. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 1456-1464. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116324596?via%3Dihub>
- Deka, M. J., Chowdhury, D., & Nath, B. K. (2022). Recent development of modified fluorescent carbon quantum dots-based fluorescence sensors for food quality assessment. *Carbon Letters*, 32(5), 1131-1149. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s42823-022-00347-5>
- Fan, Y., Qiao, W., Long, W., Chen, H., Fu, H., Zhou, C., & She, Y. (2022). Detection of tetracycline antibiotics using fluorescent "Turn-off" sensor based on S, N-doped carbon quantum dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 274, 121033. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121033>
- Fong, J. F. Y., Chin, S. F., & Ng, S. M. (2016). A unique "turn-on" fluorescence signalling strategy for highly specific detection of ascorbic acid using carbon dots as sensing probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 844-852.
- Fu, X., Sheng, L., Yu, Y., Ma, M., Cai, Z., & Huang, X. (2018). Rapid and universal detection of ovalbumin based on N, O, P-co-doped carbon dots-fluorescence resonance energy transfer technology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 269, 278-287.
- Gan, L., Su, Q., Chen, Z., & Yang, X. (2020). Exploration of pH-responsive carbon dots for detecting nitrite and ascorbic acid. *Applied Surface Science*, 530, 147269. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147269>
- Gogoi, N., Agarwal, D. S., Sehgal, A., Chowdhury, D., & Sakhuja, R. (2017). One-pot synthesis of carbon nanodots in an organic medium with aggregation-induced emission enhancement (AIEE): a rationale for "enzyme-free" detection of cholesterol. *ACS omega*, 2(7), 3816-3827. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6044871/pdf/ao7b00643.pdf>
- Hu, X., Shi, J., Shi, Y., Zou, X., Arslan, M., Zhang, W., . . . Xu, Y. (2019). Use of a smartphone for visual detection of melamine in milk based on Au@ Carbon quantum dots nanocomposites. *Food chemistry*, 272, 58-65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.021>
- Hua, J., Jiao, Y., Wang, M., & Yang, Y. (2018). Determination of norfloxacin or ciprofloxacin by carbon dots fluorescence enhancement using magnetic nanoparticles as adsorbent. *Microchimica Acta*, 185, 1-9.
- Khan, A., Ezati, P., Kim, J.-T., & Rhim, J.-W. (2022). Biocompatible carbon quantum dots for intelligent sensing in food safety applications: Opportunities and sustainability. *Materials Today Sustainability*, 100306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2022.100306>
- Kilic, B., Dogan, V., Kilic, V., & Kahyaoglu, L. N. (2022). Colorimetric food spoilage monitoring with carbon dot and UV light reinforced fish gelatin films using a smartphone application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1562-1572. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.119>
- Koshy, R. R., Koshy, J. T., Mary, S. K., Sadanandan, S., Jisha, S., & Pothan, L. A. (2021). Preparation of pH sensitive film based on starch/carbon nano dots incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. *Food Control*, 126, 108039. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108039>
- Kwon, W., Lee, G., Do, S., Joo, T., & Rhee, S. W. (2014). Size-controlled soft-template synthesis of carbon nanodots toward versatile photoactive materials. *Small*, 10(3), 506-513.
- Lai, I. P.-J., Harroun, S. G., Chen, S.-Y., Unnikrishnan, B., Li, Y.-J., & Huang, C.-C. (2016). Solid-state synthesis of self-functional carbon quantum dots for detection of bacteria and tumor cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 465-470.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. In: Springer.
- Li, B., Zhao, S., Huang, L., Wang, Q., Xiao, J., & Lan, M. (2021). Recent advances and prospects of carbon dots in phototherapy. *Chemical engineering journal*, 408, 127245. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127245>
- Li, H., Yan, X., Lu, G., & Su, X. (2018). Carbon dot-based bioplatfrom for dual colorimetric and fluorometric sensing of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 260, 563-570.
- Li, Q., Song, P., & Wen, J. (2019). Melamine and food safety: A 10-year review. *Current Opinion in Food Science*, 30, 79-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.05.008>
- Li, Y., Li, H., Wang, T., Liu, G., Wang, G., Liu, M., . . . Li, K. (2023). Surface-molecularly imprinted ratiometric fluorescence sensor for fast, sensitive and selective determination of rhodamine 6G. *Dyes and Pigments*, 219, 111602. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143720823005284>
- Li, Z., Yu, H., Bian, T., Zhao, Y., Zhou, C., Shang, L., . . . Zhang, T. (2015). Highly luminescent nitrogen-doped carbon quantum dots as effective fluorescent probes for mercuric and iodide ions. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(9), 1922-1928.
- Liang, G., Zhai, H., Huang, L., Tan, X., Zhou, Q., Yu, X., & Lin, H. (2018). Synthesis of carbon quantum dots-doped dummy molecularly imprinted polymer monolithic column for selective enrichment and analysis of aflatoxin B1 in peanut. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149, 258-264.
- Lin, B., Yan, Y., Guo, M., Cao, Y., Yu, Y., Zhang, T., . . . Wu, D. (2018). Modification-free carbon dots as turn-on fluorescence probe for detection of organophosphorus pesticides. *Food chemistry*, 245, 1176-1182.
- Liu, J., Li, R., & Yang, B. (2020). Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Science*, 6(12), 2179-2195. doi:10.1021/acscentsci.0c01306

- Liu, Y., Lu, Q., Hu, X., Wang, H., Li, H., Zhang, Y., & Yao, S. (2017). A nanosensor based on carbon dots for recovered fluorescence detection clenbuterol in pork samples. *Journal of Fluorescence*, 27, 1847-1853. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s10895-017-2122-2>
- Lu, W., Gao, Y., Jiao, Y., Shuang, S., Li, C., & Dong, C. (2017). Carbon nano-dots as a fluorescent and colorimetric dual-readout probe for the detection of arginine and Cu 2+ and its logic gate operation. *Nanoscale*, 9(32), 11545-11552. Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/nr/c7nr02336g>
- Luo, X., Han, Y., Chen, X., Tang, W., Yue, T., & Li, Z. (2020). Carbon dots derived fluorescent nanosensors as versatile tools for food quality and safety assessment: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 149-161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.017>
- Ma, Q., Lu, X., Wang, W., Hubbe, M. A., Liu, Y., Mu, J., . . . Rojas, O. J. (2021). Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100634. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100634>
- Ma, X., Lin, S., Dang, Y., Dai, Y., Zhang, X., & Xia, F. (2019). Carbon dots as an "on-off-on" fluorescent probe for detection of Cu (II) ion, ascorbic acid, and acid phosphatase. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411, 6645-6653. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-02038-z>
- Manzoor, S., Dar, A. H., Dash, K. K., Pandey, V. K., Srivastava, S., Bashir, I., & Khan, S. A. (2023). Carbon dots applications for development of sustainable technologies for food safety: A comprehensive review. *Applied Food Research*, 100263. doi:<https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100263>
- Miao, H., Wang, Y., & Yang, X. (2018). Carbon dots derived from tobacco for visually distinguishing and detecting three kinds of tetracyclines. *Nanoscale*, 10(17), 8139-8145. Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr02405g>
- Miao, X., Yan, X., Qu, D., Li, D., Tao, F. F., & Sun, Z. (2017). Red emissive sulfur, nitrogen codoped carbon dots and their application in ion detection and theranostics. *ACS applied materials & interfaces*, 9(22), 18549-18556.
- Moradi, M., Molaei, R., Kousheh, S. A., T. Guimarães, J., & McClements, D. J. (2023). Carbon dots synthesized from microorganisms and food by-products: Active and smart food packaging applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(14), 1943-1959. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2015283>
- MP, A., Pardhiya, S., & Rajamani, P. (2022). Carbon dots: an excellent fluorescent probe for contaminant sensing and remediation. *Small*, 18(15), 2105579. doi:<https://doi.org/10.1002/sml.202105579>
- Purbia, R., & Paria, S. (2016). A simple turn on fluorescent sensor for the selective detection of thiamine using coconut water derived luminescent carbon dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 467-475.
- Qian, Z., Ma, J., Shan, X., Feng, H., Shao, L., & Chen, J. (2014). Highly luminescent N-doped carbon quantum dots as an effective multifunctional fluorescence sensing platform. *Chemistry-A European Journal*, 20(8), 2254-2263.
- Qin, Y., Huang, P., & Wu, F.-Y. (2022). Histamine-responsive dye-incorporated carbon dots for visual monitoring of food spoilage. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 365, 131911. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131911>
- Qu, J.-H., Wei, Q., & Sun, D.-W. (2018a). Carbon dots: Principles and their applications in food quality and safety detection. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(14), 2466-2475.
- Qu, R., Zhang, W., Liu, N., Zhang, Q., Liu, Y., Li, X., . . . Feng, L. (2018b). Antioil Ag₃PO₄ nanoparticle/polydopamine/Al₂O₃ sandwich structure for complex wastewater treatment: dynamic catalysis under natural light. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(6), 8019-8028.
- Saad, S. M., Abdullah, J., Abd Rashid, S., Fen, Y. W., Salam, F., & Yih, L. H. (2023). Carbon dots-silver based fluorescence assay for the detection of Escherichia Coli O157: H7. *Journal of Smart Sensor and Materials*, 1(3). Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Suria-Saad/publication/340734783_A_carbon_dots_based_fluorescence_sensing_for_the_determination_of_Escherichia_coli_O157H7/links/6531fdda5d51a8012b567e4a/A-carbon-dots-based-fluorescence-sensing-for-the-determination-of-Escherichia-coli-O157H7.pdf
- Shi, R., Feng, S., Park, C. Y., Park, K. Y., Song, J., Park, J. P., . . . Park, T. J. (2020). Fluorescence detection of histamine based on specific binding bioreceptors and carbon quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 167, 112519. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112519>
- Shi, X., Wei, W., Fu, Z., Gao, W., Zhang, C., Zhao, Q., . . . Lu, X. (2019). Review on carbon dots in food safety applications. *Talanta*, 194, 809-821. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.005>
- Su, A., Wang, D., Shu, X., Zhong, Q., Chen, Y., Liu, J., & Wang, Y. (2018). Synthesis of fluorescent carbon quantum dots from dried lemon peel for determination of carmine in drinks. *Chemical Research in Chinese Universities*, 34, 164-168.
- Sun, X.-Y., Wu, L.-L., Shen, J.-S., Cao, X.-G., Wen, C., Liu, B., & Wang, H.-Q. (2016). Highly selective and sensitive sensing for Al 3+ and F- based on green photoluminescent carbon dots. *RSC advances*, 6(99), 97346-97351.
- Sun, Y.-P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A. S., Pathak, P., . . . Xie, S.-Y. (2006). Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128(24), 7756-7757. doi:10.1021/ja062677d
- Tian, J., An, M., Zhao, X., Wang, Y., & Hasan, M. (2023). Advances in Fluorescent Sensing Carbon Dots: An Account of Food Analysis. *ACS omega*, 8(10), 9031-9039. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10018703/pdf/ao2c07986.pdf>
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., & Celano, G. V. (2016). The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian journal of food safety*, 5(1).
- Veissi, M., Maktabi, S., Ramezani, Z., & Khosravi, M. (2021). Highly sensitive fluorescence assay of enterotoxin A in milk using carbon quantum dots as a fluorophore. *Food Analytical Methods*, 14, 1815-1825. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-021-02009-0>
- Wang, N., Wang, Y., Guo, T., Yang, T., Chen, M., & Wang, J. (2016). Green preparation of carbon dots with papaya as carbon source for effective fluorescent sensing of Iron (III) and Escherichia coli. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 68-75.
- Wang, R., Xu, Y., Zhang, T., & Jiang, Y. (2015a). Rapid and sensitive detection of Salmonella typhimurium using aptamer-conjugated carbon dots as fluorescence probe. *Analytical Methods*, 7(5), 1701-1706.
- Wang, S., Wang, Y., Yang, K., Zhong, Y., Yang, X., & Chen, Z. (2017). Synthesis of carbon dots originated from hydroxypropylmethyl cellulose for sensing ciprofloxacin. *Analytical Sciences*, 33(10), 1129-1134. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.2116/analsci.33.1129>

- Wang, S., Zhang, Y., Zhuo, P., Hu, Q., Chen, Z., & Zhou, L. (2020). Identification of eight pathogenic microorganisms by single concentration-dependent multicolor carbon dots. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(27), 5877-5882. Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/tb/d0tb00834f>
- Wang, T., Luo, H., Jing, X., Yang, J., Huo, M., & Wang, Y. (2021). Synthesis of fluorescent carbon dots and their application in ascorbic acid detection. *Molecules*, 26(5), 1246. Retrieved from https://mdpi-res.com/d_attachment/molecules/molecules-26-01246/article_deploy/molecules-26-01246-v2.pdf?version=1614569278
- Wang, Y., Wu, W.-t., Wu, M.-b., Xie, H., Hu, C., Wu, X.-y., & Qiu, J.-s. (2015b). Yellow-visual fluorescent carbon quantum dots from petroleum coke for the efficient detection of Cu²⁺ ions. *New Carbon Materials*, 30(6), 550-559.
- Wawrzyniak, J., Ryniecki, A., & Zembrzuski, W. (2005). Application of voltammetry to determine vitamin C in apple juices. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 4(2), 5-16.
- Xu, J., Zhou, Y., Cheng, G., Dong, M., Liu, S., & Huang, C. (2015). Carbon dots as a luminescence sensor for ultrasensitive detection of phosphate and their bioimaging properties. *Luminescence*, 30(4), 411-415.
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736-12737.
- Xu, Z.-L., Ye, S.-L., Luo, L., Hua, X., Lai, J.-X., Cai, X.-P., . . . Chen, Y.-p. (2020). Fluorescent enzyme-linked immunoassay based on silane-doped carbon dots for sensitive detection of microcystin-LR in water and crucian samples. *Science of The Total Environment*, 708, 134614. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134614>
- Yan, F., Shi, D., Zheng, T., Yun, K., Zhou, X., & Chen, L. (2016). Carbon dots as nanosensor for sensitive and selective detection of Hg²⁺ and L-cysteine by means of fluorescence "Off-On" switching. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224, 926-935.
- Yan, J., Fu, Q., Zhang, S., Shi, X., Zhang, Y., Hou, J., . . . Ai, S. (2023). Fluorescent filter paper with pH-responsive carbon dots for the on-site detection of biogenic amines in food. *New Journal of Chemistry*, 47(16), 7588-7594. doi:<https://doi.org/10.1039/D3NJ00646H>
- Yang, L., Deng, W., Cheng, C., Tan, Y., Xie, Q., & Yao, S. (2018a). Fluorescent immunoassay for the detection of pathogenic bacteria at the single-cell level using carbon dots-encapsulated breakable organosilica nanocapsule as labels. *ACS applied materials & interfaces*, 10(4), 3441-3448.
- Yang, M., Li, B., Zhong, K., & Lu, Y. (2018b). Photoluminescence properties of N-doped carbon dots prepared in different solvents and applications in pH sensing. *Journal of Materials Science*, 53(4), 2424-2433.
- Yang, P., Zhu, Z., Chen, M., Zhou, X., & Chen, W. (2019). Microwave-assisted synthesis of polyamine-functionalized carbon dots from xylan and their use for the detection of tannic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 213, 301-308. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.043>
- Yang, X., Xu, J., Luo, N., Tang, F., Zhang, M., & Zhao, B. (2020). N, Cl co-doped fluorescent carbon dots as nanoprobe for detection of tartrazine in beverages. *Food chemistry*, 310, 125832. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125832>
- Yao, D., Li, C., Wen, G., Liang, A., & Jiang, Z. (2020). A highly sensitive and accurate SERS/RRS dual-spectroscopic immunosensor for clenbuterol based on nitrogen/silver-codoped carbon dots catalytic amplification. *Talanta*, 209, 120529. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120529>
- Yu, M., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, Y., Shang, M., Wang, L., . . . Lv, X. (2022a). A colorimetric and fluorescent dual-readout probe based on red emission carbon dots for nitrite detection in meat products. *Food chemistry*, 374, 131768. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131768>
- Yu, Y., Zhang, L., Gao, X., Feng, Y., Wang, H., Lei, C., . . . Liu, S. (2022b). Research Progress in the Synthesis of Carbon Dots and Their Application in Food Analysis. *Biosensors*, 12(12), 1158. Retrieved from https://mdpi-res.com/d_attachment/biosensors/biosensors-12-01158/article_deploy/biosensors-12-01158-v2.pdf?version=1671522355
- Zhang, X., Chen, C., Peng, D., Zhou, Y., Zhuang, J., Zhang, X., . . . Hu, C. (2020). pH-Responsive carbon dots with red emission for real-time and visual detection of amines. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(33), 11563-11571. doi:<https://doi.org/10.1039/D0TC02597F>
- Zhang, Y., Cui, P., Zhang, F., Feng, X., Wang, Y., Yang, Y., & Liu, X. (2016). Fluorescent probes for "off-on" highly sensitive detection of Hg²⁺ and L-cysteine based on nitrogen-doped carbon dots. *Talanta*, 152, 288-300.
- Zhang, Y., Zhang, W., Chen, K., Yang, Q., Hu, N., Suo, Y., & Wang, J. (2018a). Highly sensitive and selective colorimetric detection of glutathione via enhanced Fenton-like reaction of magnetic metal organic framework. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 262, 95-101.
- Zhang, Z., Chen, J., Duan, Y., Liu, W., Li, D., Yan, Z., & Yang, K. (2018b). Highly luminescent nitrogen-doped carbon dots for simultaneous determination of chlortetracycline and sulfasalazine. *Luminescence*, 33(2), 318-325.
- Zhao, C., Jiao, Y., Zhang, L., & Yang, Y. (2018). One-step synthesis of S, B co-doped carbon dots and their application for selective and sensitive fluorescence detection of diethylstilbestrol. *New Journal of Chemistry*, 42(4), 2857-2864.
- Zhong, D., Zhuo, Y., Feng, Y., & Yang, X. (2015). Employing carbon dots modified with vancomycin for assaying Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 546-553.
- Zhou, L., Lin, Y., Huang, Z., Ren, J., & Qu, X. (2012). Carbon nanodots as fluorescence probes for rapid, sensitive, and label-free detection of Hg²⁺ and biothiols in complex matrices. *Chemical communications*, 48(8), 1147-1149. Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c2cc16791c>
- Zhou, M., Zhou, Z., Gong, A., Zhang, Y., & Li, Q. (2015). Synthesis of highly photoluminescent carbon dots via citric acid and Tris for iron (III) ions sensors and bioimaging. *Talanta*, 143, 107-113.
- Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano research*, 8, 355-381.
- Zu, F., Yan, F., Bai, Z., Xu, J., Wang, Y., Huang, Y., & Zhou, X. (2017). The quenching of the fluorescence of carbon dots: a review on mechanisms and applications. *Microchimica Acta*, 184, 1899-1914.



Trends in Coconut Brown Sugar Production – A Review of Health and Future Prospect in the Industry

Frederick Sarpong^{1,a,*}, Dominic Kwadwo Anning^{1,b}, Charlotte Oduro-Yeboah^{2,c}

¹Council for Scientific and Industrial Research (CSIR)-Oil Palm Research Institute, P. O. Box 74, Kade, Ghana.

²Council for Scientific and Industrial Research (CSIR)- Food Research Institute, Accra Ghana

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Review Article

Received : 03.06.2024

Accepted : 19.08.2024

Keywords:

Coconut sap
Nutritional composition
Health benefit
Glycemic index
Maillard reaction

In recent times, several publications on processing of brown coconut sugar have been carried out, which present an excellent option for health-conscious consumers in the global market. The goal was to discuss and present recent developments in the industry, highlight the numerous health benefits and forecast into the future prospects of the industry. From the discussion, coconut sugar contains all the essential amino acids, various vitamins, minerals, phenolic and antioxidant compounds. These antioxidants are very important in the prevention of heart disease, cancer and inflammatory diseases, whilst the polyphenols inhibited the formation of cancer cells by reducing DNA hypermethylation. Vitamins also play an important role in metabolic reactions by acting as transcription effectors and electron donors. Coconut sugar is also known to prevent kidney stone formation and renal diseases by flushing out formed stones and plays an important role in the revitalization and proper functioning of the kidney due to its high potassium content. With a global trade volume of USD 1.33 billion and a compound annual growth rate (CAGR) of 8%, the industry has great prospects. However, restraints such as high labor intensity, environment-friendly demand, and lack of mechanization require immediate attention to salvage the industry.

^a ashesdotcom@yahoo.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-3463-6694>

^c kwadwoanning@gmail.com

^d <https://orcid.org/0000-0002-3463-6694>

^e fredsarpong2016@gmail.com

^f <https://orcid.org/0000-0002-3463-6694>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Coconut sugar is obtained from the sap of coconut, a sweet, golden brown-colored fluid extracted from the immature inflorescences of the coconut (Nurhadi et al., 2020). The sap is tapped from the immature inflorescences of the coconut that have not yet opened and can be tapped 12 to 15 times a year (Jose, 2013). The main component of coconut sap is sucrose, which accounts for more than 80% of the total solid, followed by a small amount of glucose and fructose of about 2.3% of the total solid (Nurhadi et al., 2018). The extraction of coconut sap production has received popularity in the coconut sector recently (Nurhadi et al., 2020). Coconut sap, like the sap from other palms, is often consumed directly by the population and is highly valued for its nutritional properties (Nurhadi et al., 2018). However, coconut sap is most valued for its conversion into syrup and sugar (Muriel et al., 2019).

Coconut sugar is a natural sweetener obtained through evaporation of coconut sap (Nurhadi et al., 2020). It forms a crystalline sweetener with sugar characteristics, completely natural and highly nutritious, with superior tastes (Abdullah et al., 2014). Conventionally, it is

produced by heating the sap until a saturated solution is formed, which crystallizes and forms coconut sugar powder (Nurhadi et al., 2020). Coconut sugar has the potential to be a better substitute for synthetic sugar. It can be used as a sweetener for coffee, tea, chocolate drinks and other baked foods, as well as a cooking ingredient (Asghar, Muhammad T et al., 2020; Hebbar et al., 2015). It has a wider range of applications and is used in various types of traditional cuisine and in beverages as flavor and color enhancer (Karseno et al., 2018). The texture and flavor of coconut sugar are similar to those of brown sugar (Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al., 2020). Thus, coconut sugar can easily replace regular table sugar. In this paper, we discuss the recent development in the coconut sugar industry, the health benefit of its nutrients and explore its future prospect for the industry. Therefore, the purpose of the review was to discuss and showcase recent developments in the coconut sap brown sugar production, emphasizing the numerous health benefits, and forecast the industry's future possibilities.

Methodology

In the review exercise a narrative review approach was used to provide a broad overview of a topic, drawing from various sources to synthesize knowledge and highlight trends, gaps, and future research directions. In this approach database source such as PubMed, Scopus, Web of Science, ScienceDirect, Francis and Taylor, Wiley's and link springer were used for literature search strategy. For a detailed keywords, phrases and Boolean, words such as coconut sap, nutritional composition, health benefit, glycemic index, and Maillard reaction were used for the review. The criteria used to include or exclude this review studies during informational search included publication date (not more than 20 years) and language (English only). All study design and other related research questions were allowed during the search. For data validity and reliability, the approach of cross-referencing data from multiple sources was applied during the data and information search.

Coconut Sap Production

Coconut sap is tapped from unopened inflorescence, where the heads are sliced and covered with a bowl to collect the sweet fluid sap over time. To stimulate flow of sap, the inflorescences are struck evenly with traditional tools such as wooden ladle to accelerate the flow of sap. The collection of sap as shown in Figure 1, requires time (at least of 8–12 h) and traditionally the surface of the collection bowl is coated to prevent fermentation of sucrose in the sap (Ghosh et al., 2018; Hebbar et al., 2022). Freshly collected sap is sweet, golden brown in color and slightly alkaline (average pH of 7.8) and ferments rapidly within 2-3 h to lower pH under room conditions if not refrigerated or properly preserved.

Wide variation in sap yields has been reported in many literature ranging from 0.2 – 1.5 L/ palm day, which is attributed to coconut variety (or genomes), length of internodes, size of inflorescence sheaths, season and time, age of plant and inflorescence and agronomical practices. Magat (1996) found a positive correlation between higher fruit set and plant age and higher sap production. However, younger and well-maintained plants produce high-quality sap for sugar production (Asha et al., 2019). Borin and Preston (1995) also noted that sap flow varies with time and reported a higher sap flow during the night compared to the day.

Sap nutritional composition

Coconut sap is highly rich in nutrients, and its nutritional composition and quality varies with location, time and tapping duration (Xia et al., 2011). Because of its nutritional properties, some researchers have often proposed the use of coconut sap for babies whose mothers are unable to produce breast milk. As a result of high sugar content (15%), coconut sap is susceptible to spontaneous fermentation by lactic acid bacteria, which reduces the sugar to 5% hence initiating the preservation mechanism. The sap also contains amino acids, organic acids, vitamins (Hebbar et al., 2020; TOMOMATSU et al., 1996; Xia et al., 2011), protein, phenolics, antioxidants (Devi et al., 2015) and minerals (Flores-Gallegos et al., 2019).

The sugar composition identified in coconut sap is sucrose, fructose and glucose and there is a general agreement in the literature that sucrose accounts for a high percentage of the identified sugar in the sap. However, the percentage reported for each type of sugar differs from one study to another. For example, Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al. (2020) reported 6.91%, 3.48%, and 2.53%, while Somawiharja et al. (2018) observed 5.76%, 3.23%, and 2.25% for sucrose, fructose and glucose, respectively. In the work published by Veena et al. (2018), 13.8% sucrose was detected in coconut sap whilst fructose and glucose were not detected in the sap. Previously, sucrose content of 17.78% was reported in coconut sap (Nurhadi et al., 2018), and these variations are ascribed to coconut varieties, time and method of tapping and plant maturity. Other sugars such as mannose and glycerol were also discovered in minute quantities by Ysidor et al. (2014).

So far, 16 amino acids have been detected in coconut sap (Flores-Gallegos et al., 2019; Magat, 1996; Xia et al., 2011), but only 12 of them were identified by Chinnamma et al. (2019). The most interesting aspect of the amino acid constituents in coconut sap is the presence of all the essential amino acids required for human growth, which is why it is recommended by many for infants. Chinnamma et al. (2019) reported higher content of histidine, cystine, arginine and tyrosine in coconut sap, whereas Purnomo (2007) observed glutamic acid, aspartic acid, threonine and serine as prominent amino acids in fresh sap.



Figure 1: Traditional method used to collect coconut sap in Ghana

Eleven (11) water-soluble vitamins were detected in coconut sap, with vitamin C (116 mg/L) showing the highest value, while B7 also known as biotin was found to be only 0.0017 mg/L (Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al., 2020; Sudha et al., 2019). The other water-soluble vitamins identified are B1, B2, B3, B4 B6, B8, B9, B10 and B12. Ghosh et al. (2018) detected vitamin E and associated coconut sap consumption with an increase in normal liver function. In addition to the water-soluble vitamin, Hebbar et al. (2020) also observed fat-soluble-vitamins such as ergocalciferol, tocopherol, cholecalciferol, vitamin K1, and K2. Coconut sap contains many phenolic compounds, of which Borse et al. (2007) identified and quantified twenty-one (21). Among the identified volatile compounds discovered by gas chromatographic–mass spectrometric analysis, palmitic acid was most dominant volatile phenolic compound, reaching 2.024 mg/100 g with a retention time of 88.68 min. In addition to palmitic acid, other dominant volatile compound constituents include 3-hydroxy-2-pentanone, ethyl lactate, ethyl lactate, phenylethyl alcohol, tetradecanone, farnesol and 2-methyl tetrahydrofuran (Hebbar et al., 2018). Interestingly, more phenolic compounds are detected when coconut sap is fermented or converted to sugar through Maillard reaction.

Several mineral compositions in coconut sap have been reported in literature. For example, Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al. (2020) observed 8 minerals, namely potassium, calcium, sodium, magnesium, manganese, iron and zinc in varying quantities. However, potassium (960.87 mg/L) dominated in terms of quantities followed by sodium (183.21 mg/L) and magnesium (22.91 mg/L). In addition, phosphorus and copper were also detected in coconut sap, as reported by Sudha et al. (2019). Traces of selenium were also detected and reported Dayrit and Nguyen (2020). Finally, chlorine and bromine were reported to bring the total mineral elements in coconut sap to thirteen (Joelle et al. (2017).

Production of Coconut Brown Sugar

Coconut sap is susceptible to fermentation due to its high sucrose content; hence it is frozen or processed immediately after collection. Coconut sap sugar is one of the secondary processing products. It has a longer shelf life compared to sap. Traditionally, sap is concentrated by applying heat at a temperature of 100-120°C for a period of 3-5 h in an open pan. It is well known that processing conditions such as high temperature and prolonged heating time affect the quality of sugar, so an alternative approach is being sought to improve the chemical and physical properties of the final product (Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan, et al., 2020). Instead of traditional open-source heating, microwave power has been successfully used to concentrate the sap into syrups and drastically reduce the heating time. In a study by Asghar, Muhammad T et al. (2020), the heating time for the conversion of coconut sap to sugar syrup using open heat or microwaves was significantly reduced from 46.8 min to 9.4 min. However, a microwave cannot be used to form sugar crystals because constant stirring is required.

Another clean and fast heating technique used in the production of coconut sugar is the rotary evaporation technique, which was adopted from the pharmaceutical industry. Rotary evaporation reduces the volume of water in the sap by distributing it in a thin film of a vessel interior at higher temperature and lower pressure. It is based on the principle that when the pressure on the solvent is reduced, evaporation of the analytes occurs as a result of the lower atmospheric pressure. Therefore, with an additional increase in temperature, solvent (water) in the coconut sap evaporates rapidly and concentrates the less volatile substance. The rotary evaporator consists of four main parts, namely water bath, condenser, solvent trap and rotor, which are used to fractionate solvent-phase mixtures to concentrate a particular compound of interest, as shown in Figure 2.

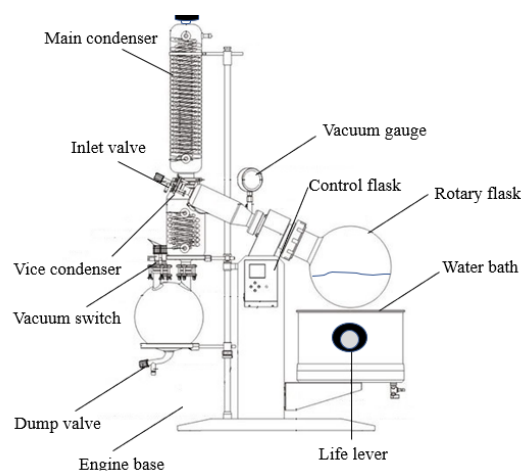


Figure 2. Rotary evaporation mechanism used to evaporate coconut sap

Rotary evaporation technology is quite new in the sugar industry, and therefore few researchers have reported its results in the industry. For example, Asghar, Muhammad T et al. (2020) reported the shortest processing time of 12.2 min for converting coconut sap into syrup compared to microwave (13 min) and open heating system (46.8 min). In addition to saving time, rotary evaporation operates at lower temperatures to reduce the browning reaction to improve the color formation of the final product. In terms of energy consumption, rotary evaporation has an advantage over the open heating system commonly used in the industry. However, a comparative energy analysis revealed that the microwave is the best choice in the coconut sugar industry.

Factors affecting quality aspect of coconut sugar

The quality aspect of coconut sugar in general has been discussed by different authors under two main aspects. These include quality related to the inherent properties of the coconut sap used to produce the sugar and the quality associated with processing, which may reduce its nutritional properties or make it unhealthy for consumption. Therefore, the quality aspect of coconut sugar is divided into two categories, namely inherent/natural factors and processing-related factors.

Natural factors known to affect coconut sugar include seasons, with dry seasons found to produce more nutritious sugar than rainy seasons (Susanti et al., 2021). Other inherent or natural factors that play a critical role in the quality of coconut sugar include soil type, plant variety, inflorescence size, time and age of the plant.

Processing factors that affect sugar quality begin with sap extraction, where the tools used have a direct impact on the quality of the sugar produced. During tapping, some practices such as mixing the already tapped sap with the freshly tapped one generally reduce the quality of the sugar. The use of hazardous chemicals such as sodium bisulfite to reduce the enzymatic browning reaction has health implications and thus affects the quality of coconut sugar (Sarpong et al., 2018). Processing temperatures are also directly related to the colour formation of the final products. In this case, higher temperatures lead to a stronger browning reaction as shown by Maillard reactions in Figure 3. To produce Maillard reactions, amino acids and sugars are converted in the presence of heat to 2-furoylmethyl-amino acids (2-FM-AA), which are often used to describe the onset of the Maillard reaction. The 2-FM-AA are measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the degree of Maillard reaction in agricultural products. The 2-FM-AA compound further reacts with amino acids to produce Amadori products to initiate the formation of brown pigmentations (Sarpong et al., 2019)

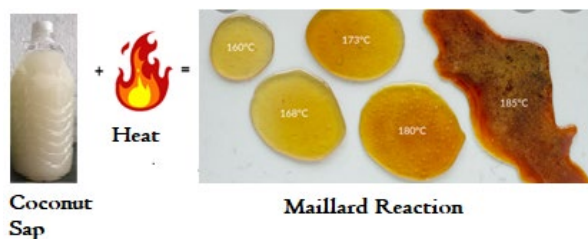


Figure 3. Depiction of temperature effect on Maillard reaction in sugar production

Comparative Nutritional Analysis of Coconut Sap and Sugar

The nutritional composition of brown coconut sugar depends in part on the conditions and method used in processing. Compared to sap, it can be seen that the nutrients in the brown sugar either increase or decrease depending on the processing conditions. In some cases, new phenols and flavors are formed in the brown sugars during processing of the sap to increase the nutrient composition. For instance, Kabir and Lorjaroenphon (2014) discovered nineteen additional volatile compounds compared to coconut sap and concluded that acetic acid is the most abundant compound in coconut sugar. This is attributed to the formation of amino-complex compounds that releases additional aroma-containing volatiles upon heating and continue to increase over time (Reineccius, 1999). However, other heat-sensitive nutrients such as proteins, vitamins, polyphenols, etc., are generally reduced during the conversion of sap to brown sugar.

Health Benefits of Coconut Brown Sugar

The nutritious component of brown coconut sugar is praised by health experts around the world compared to other forms of sugar. This is because coconut sugar contains comparatively high levels of antioxidants, which are known to protect cells from free radicals, preventing heart disorders, cancer, and inflammatory diseases (Jiang & Medicine, 2014). In addition, the polyphenol content of coconut sugar has been found to play an important role in controlling blood pressure by promoting good blood flow (Famurewa & Ejezie, 2018). Famurewa and Ejezie (2018) reported that the polyphenol content of food components has the ability to inhibit cancer cell formation by reducing DNA hypermethylation. Finally, regular consumption of coconut sugar promotes anti-inflammation defense mechanism in humans due to its high polyphenol contents (Sunil et al., 2020)

The numerous vitamins in coconut sugar also play an importance role in metabolic reactions by acting as transcription effectors and electron donors (Gunnar, 2018). In addition to the general well-being of vitamins in the body, individual vitamins have various health roles in the body to ensure the overall functioning of the human system. For example, the metabolic activities of cells and their functions are maximized when B vitamins are present, and coconut sugar in particular contains all the different forms of vitamin B-complex (Rajamohan & Archana, 2018). Thiamine (vitamin B1) in coconut sugar is known to promote the metabolism of fats, proteins, and carbohydrates, whilst riboflavin (vitamin B2) on the other hand, supports the breakdown of steroids, hormones, and drugs. Therefore, people with diabetics condition are recommended to include coconut sugar in their diet to break down sugar and lower sugar levels (Rajamohan & Archana, 2018; Scrob et al., 2022). This is because research by Chen et al. (2017) revealed that thiamine significantly improved insulin levels in patients within six weeks of administration. Finally, thiamine found in coconut sugar plays a vital role in converting food into energy and also helps in the formation of brain cells (Chen et al., 2017). Other B-complex vitamins such as B3 and B6 found in coconut sugar play a significant role in the formation of coenzymes used in digestion and contribute to the proper functioning of the nervous system (Chen et al., 2017).

Coconut sugar contains 16 amino acids, including all the essential amino acids used as building blocks for polypeptides and proteins. The health benefits of these amino acids contained in coconut sugar are very important for the formation of neurotransmitter, which is important for digestion and immune response (Asha et al., 2019; Li et al., 2021). Purnomo (2007) discovered histidine, one of the essential amino acids in coconut sugar, which is known to play a vital role in digestion, immune response, sleep-wake cycles, and sexual function. Besides, histidine also functions as a shaping myelin sheath around the central nervous system and serves as a barrier for nerve cells. Another essential amino acid is threonine, which is abundant in coconut sugar and has an important function in the formation of elastin and collagen for healthy skin and connective tissue.

Other amino acids such as glutamine and arginine protect the stomach and gastrointestinal tract and help remove excess ammonia from the body.

Coconut sugar contains important minerals such as potassium, sodium, and magnesium (Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al., 2020), which regulate body's water content and cell hydration. These minerals also play an important role in many heart, nerve, and muscle functions. Coconut sugar prevents kidney stone formation and renal diseases by flushing out formed stones and plays an important role in the revitalization and proper functioning of the kidney due to its high potassium content (Anwar et al., 2018).

In addition, coconut sugar contains trace elements such as iron, zinc, bromine, and calcium, which are known to strengthen bones (Okoma et al., 2020). The minerals found in coconut sugar, especially potassium and iron, play an important role in maintaining cardiac automatism and promoting digestion and assimilation (Okoma et al., 2020). Coconut sugar is considered a raw food because it is made only from dehydrated coconut sap and thus contains all the beneficial antioxidants such as polyphenols, flavonoids and anthocyanidins of the original source. These antioxidants prevent cell oxidation in the body and thus prevent ageing. Coconut sugar contains polyphenols, dietary fibers and amino acids such as leucine, isoleucine, and arginine, which have the potential to scavenge free radicals and control streptozotocin-induced hyperglycemia (Renjith et al., 2013). Coconut sugar is rich in vitamin C, which supports healthy joints and skin and boosts the immune system. It also contains inulin, which balances blood glucose levels by slowing glucose absorption, preventing colon cancer, and protecting the intestines. Inulin plays an important role in reducing the risk of intestinal diseases such as irritable bowel disease and colon cancer (Shoaib et al., 2016). Inulin stimulates the immune system, which fights harmful substances in the body by identifying and acting on antigens (Shoaib et al., 2016). Coconut sugar also contains dietary fiber, which supports weight loss, improves serum lipoprotein levels, reduces the risk of coronary heart disease, stroke, hypertension, gastrointestinal disease, and obesity, and improves blood glucose control in diabetic patients (Anderson et al., 2009). Coconut sugar contains polyphenols that inhibit lipogenesis, reduce inflammation, and improve weight loss and maintenance (Wang et al., 2014). Flavonoids present in coconut sugar neutralize free radicals and help reduce cancer risk by inhibiting cell growth in tumours (Wang et al., 2014). Flavonoids have been reported to lower blood pressure, reduce platelet activity, modulate enzymes, and promote vascular health (Zhou et al., 2016)

Glycemic Index

Sugar consumption in foods, beverages, and confectionery has recently increased the threat of diabetes, obesity, hypertension, and heart disease in many people worldwide (Chattopadhyay et al., 2014), which is due to their high glycemic index. The glycemic index (GI) is a food classification system based on how a food affects blood glucose levels compared to a standard glucose solution or starchy food (Trinidad et al., 2010). GI is used to categorize carbohydrate-containing foods, as well as

their ability to raise blood sugar and how quickly they do so. A glycemic index between 70 and 100 is considered high, between 56 and 69 is considered medium, and from 0 to 55 is considered low (Ghosh et al., 2018). Foods with a low glycemic index contain unrefined and complex carbohydrates that break down slowly into glucose, therefore limiting the release of usable energy and thus controlling blood sugar levels. Coconut sugar has a lower GI of 35 (Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al., 2020; Trinidad et al., 2010) compared to most commercial sugars such as table sugar, cane sugar, and honey with a glycemic index of 70, 68, and 55, respectively (Ghosh et al., 2018). This implies that coconut sugar has the potential to reduce blood sugar levels, reduce cholesterol and maintain body weight when compared with other forms of sugar. From the perspective of GI, incorporating coconut sugar into the diet has the benefit of reducing the risk of heart disease, preventing type 2 diabetes, curbing appetite to reduce body mass and promoting the general well-being of the body.

Future prospect of the industry

Brown coconut sugar is rapidly becoming a trading commodity among Asian countries such as Indonesia, Philippines and Thailand, which have the potential to catch up in terms of production in the global market. The size of the global market for this commodity was 123,408 metric tons in 2020, valued at USD 1.33 billion, with a compound annual growth rate (CAGR) of 8% (WIRE, 2020). The brown coconut sugar market is very lucrative, as it is a global alternative consumption to white sugar, which is directly correlated with obesity, hypertension and heart disease; and has recently surged. This has attracted wealthy countries to import the commodity in large quantities for their citizens (Figure 4). Currently, China is the leading importer with a market share of 17.29%, whilst Indonesia is the leading exporter of the commodity. The market trend is projected to flourish in the coming days in Europe due to its nutritional benefits as compared to other forms of sugar in the international market. Due to the rising population and health awareness, all the market analysts have predicted lucrative growth of the commodity in the Asia-Pacific and Europe (Tridge, 2022).

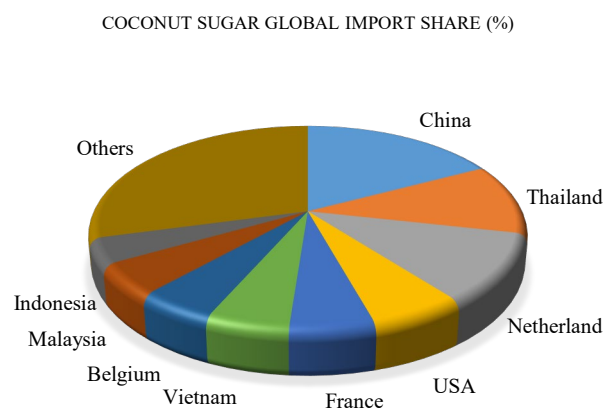


Figure 4. The global import market share of coconut brown sugar. Source (Tridge, 2022)

The commodity can be easily melted and mixed in recipes while creating a caramel-flavoured aroma, which has led to an increase in global demand of the commodity, attracting wider usage (Research, 2022). In addition to the direct consumption of the commodity, coconut sugar has a variety of uses. For instance, coconut sugar is used in the cosmetics and personal care industry for body scrubs, lotions, and creams as it has exfoliating and non-toxic properties, which has contributed to their market growth. The bakery industry has also discovered the product through its use in seasoning, beverages, confectionery, and baking.

Therefore, natural sweeteners such as coconut sugar have received much attention in recent decades as a healthier alternative. Coconut sugar production provides a better opportunity for coconut farmers by generating additional income for their businesses. Asghar, Muhammad Tuseef, Yus Aniza Yusof, Mohd Noriznan Mokhtar, et al. (2020) documented that one hectare of coconut can produce about 19 tons of sugar per year, which is more than sugarcane production (5-10 tons of sugar per year). In addition, the production of coconut sugar provides a great benefit to the environment, consumers, and the local economy (Hebbar et al., 2015).

The commodity market also faces some constraints, such as getting large volumes onto the global market, as processing is very labor-intensive. With the goal of producing environmental-friendly products, the processing of the commodity has further slowed down, which has hindered the release of the product to meet the market demand. Another obstacle in the industry is the cost of production, which is comparatively higher than processing other forms of sugar. To mitigate these challenges, it is proposed to mechanize processing to reduce the labor intensity and shorten production time.

Conclusion

In this paper, we reviewed recent developments in the coconut sugar industry, the health benefits, and future prospects for the industry. It became clear that coconut sugar is superior to sweetener available in the market due to its nutritional properties. It was observed that coconut sugar contains all the essential amino acids, 16 vitamins, numerous identified and quantified phenolic compounds, and several minerals in various proportions. Due to its high susceptibility to fermentation, coconut sap is processed into sugar, with methods such as open heat, microwave, and rotary evaporation. Brown coconut sugar is highly rich in nutrients with accompanying health benefits, and has drawn global attention to the commodity such that production is not able to meet the demand. This is due to some limitations, such as high labor intensity, environmental-friendly demand and lack of mechanization. However, the future prospects for the commodity are promising, as the growing awareness of its health benefits supersedes the available alternatives.

Declarations

Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Abdullah, W. G., Rianse, U., Iswandi, R. M., Taridala, S. A. A., Rianse, I. S., Zulfikar, L., Baka, L. R., La Abdi, A., Cahyono, E., & Widayati, W. J. A. i. E. B. (2014). Potency of natural sweetener: Brown sugar. *8*(21), 374-386.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. J. N. r. (2009). Health benefits of dietary fiber. *67*(4), 188-205.
- Anwar, N. Z. R., Jamaluddin, A., Shahidan, N., & Zakaria, Z. J. J. o. A. (2018). Nutritional composition and glycaemic index of milk chocolate using different sweeteners. *9*(1S), 62-68.
- Asghar, M. T., Yusof, Y. A., Mokhtar, M. N., Ya'acob, M. E., Mohd. Ghazali, H., Chang, L. S., Manaf, Y. N. J. F. s., & nutrition. (2020). Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *8*(4), 1777-1787.
- Asghar, M. T., Yusof, Y. A., Mokhtar, M. N., Yaacob, M. E., Ghazali, H. M., Varith, J., Chang, L. S., Manaf, Y. N. J. J. o. t. S. o. F., & Agriculture. (2020). Processing of coconut sap into sugar syrup using rotary evaporation, microwave, and open-heat evaporation techniques. *100*(10), 4012-4019.
- Asghar, M. T., Yusof, Y. A., Noriznan, M., Yaacob, M. E., Mohd Ghazali, H., Chang, L. S., Manaf, Y. N. J. I. J. o. F. S., & Technology. (2020). Effect of processing method on vitamin profile, antioxidant properties and total phenolic content of coconut (*Cocos nucifera* L.) sugar syrup. *55*(7), 2762-2770.
- Asha, S., Ratheesh, M., Jose, S. P., Krishnakumar, I., & Sandya, S. (2019). NEERA: a nonalcoholic nutritious beverage from unopened inflorescence of coconut palm. In *Natural beverages* (pp. 339-360): Elsevier.
- Borin, K., & Preston, T. J. L. R. f. R. D. (1995). Conserving biodiversity and the environment and improving the wellbeing of poor farmers in Cambodia by promoting pig feeding systems using the juice of the sugar palm tree (*Borassus flabellifer*). *7*(2), 25-29.
- Borse, B. B., Rao, L. J. M., Ramalakshmi, K., & Raghavan, B. J. F. C. (2007). Chemical composition of volatiles from coconut sap (neera) and effect of processing. *101*(3), 877-880.
- Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. J. J. o. f. s., & technology. (2014). Artificial sweeteners—a review. *51*(4), 611-621.
- Chen, Y. B., Wang, Y. F., Hou, W., Wang, Y. P., Xiao, S. Y., Fu, Y. Y., Wang, J., Zheng, S. W., & Zheng, P. H. J. J. o. G. R. (2017). Effect of B-complex vitamins on the antifatigue activity and bioavailability of ginsenoside Re after oral administration. *41*(2), 209-214.
- Chinnamma, M., Bhasker, S., Binitha Hari, M., Sreekumar, D., & Madhav, H. J. B. (2019). Coconut neera—a vital health beverage from coconut palms: harvesting, processing and quality analysis. *5*(1), 22.
- Dayrit, F. M., & Nguyen, Q. (2020). Improving the Value of the Coconut with Biotechnology. In *Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life'* (pp. 29-50): Springer.
- Devi, N. S., Hariprasad, T., Ramesh, K., & Merugu, R. J. I. J. o. P. R. (2015). Antioxidant properties of coconut sap and its sugars. *8*(1), 160-162.
- Famurewa, A. C., & Ejezie, F. E. J. A. J. o. P. (2018). Polyphenols isolated from virgin coconut oil attenuate cadmium-induced dyslipidemia and oxidative stress due to their antioxidant properties and potential benefits on cardiovascular risk ratios in rats. *8*(1), 73.
- Flores-Gallegos, A., Vázquez-Vuelvas, O., López-López, L., Sainz-Galindo, A., Ascacio-Valdes, J., Aguilar, C. N., & Rodriguez-Herrera, R. (2019). Tuba, a fermented and refreshing beverage from coconut palm sap. In *Non-Alcoholic Beverages* (pp. 163-184): Elsevier.

- Ghosh, D., Bandyopadhyay, A., Das, S., Hebbar, K., Biswas, B. J. I. J. o. C. M., & Sciences, A. (2018). Coconut sap (Neera)-untapped opportunity of spinoff gains in West Bengal, India. *7(9)*, 2319-7706.
- Gunnar, K. J. J. H. (2018). Coconut Sugar—A Healthy Sugar Alternative or a Big, Fat Lie. *1-12*.
- Hebbar, K., Arivalagan, M., Manikantan, M., Mathew, A., Thamban, C., Thomas, G. V., & Chowdappa, P. J. C. S. (2015). Coconut inflorescence sap and its value addition as sugar-collection techniques, yield, properties and market perspective. *1411-1417*.
- Hebbar, K., Arivalagan, M., Pavithra, K., Roy, T., Gopal, M., Shivashankara, K., Chowdappa, P. J. J. o. F. M., & Characterization. (2020). Nutritional profiling of coconut (Cocos nucifera L.) inflorescence sap collected using novel coco-sap chiller method and its value added products. *14(5)*, 2703-2712.
- Hebbar, K., Pandiselvam, R., Manikantan, M., Arivalagan, M., Beegum, S., & Chowdappa, P. J. S. T. (2018). Palm sap—Quality profiles, fermentation chemistry, and preservation methods. *20(6)*, 621-634.
- Hebbar, K., Ramesh, S., Ghosh, D., Beegum, P., Pandiselvam, R., Manikantan, M., & Mathew, A. J. S. T. (2022). Coconut Sugar-a Potential Storehouse of Nutritive Metabolites, Novel Bio-products and Prospects. *1-16*.
- Jiang, Q. J. F. R. B., & Medicine. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *72*, 76-90.
- Joelle, O. D. M., Ysidor, K. N. G., Jean-Louis, K. K., Rachel, A. R., & Marius, B. G. H. (2017). Mineral Nutrients in Inflorescence Sap Produced from Various Coconuts (Cocos nucifera L.) Cultivated in Côte d'Ivoire.
- Jose, T. J. I. C. J. (2013). Neera for the revival of coconut economy. *56(1)*, 2-3.
- Kabir, A., & Lorjaroenphon, Y. (2014). *Identification of aroma compounds in coconut sugar*. Paper presented at the Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. Kasetsart University, Thailand.
- Karseno, E., Yanto, T., Setyowati, R., & Haryanti, P. J. F. R. (2018). Effect of pH and temperature on browning intensity of coconut sugar and its antioxidant activity. *2(1)*, 32-38.
- Li, X., Han, T., Zheng, S., Wu, G. J. A. A. i. N., & Health. (2021). Nutrition and functions of amino acids in aquatic crustaceans. *169-198*.
- Magat, S. (1996). *Intercropping and toddy/sugar production in coconut-based farming system: Possible integration with germplasm conservation and varietal improvement*. Paper presented at the Proceedings of the Workshop on User's Perspective to promote multiuses and competitive of the coconut. Chumpon, Thailand.
- Muriel, J. O. D., Jean-Louis, K. K., Rebecca, R. A., & Ysidor, K. N. J. J. o. E. A. I. (2019). Development of a Method to Produce Granulated Sugar from the Inflorescences Sap of Coconut (Cocos nucifera L.) in Ivory Coast: Case of Hybrid PB113.
- Nurhadi, B., Sukri, N., Saputra, R. A., Wandhani, F. I., & Nurlita, A. I. J. I. J. o. F. S. (2020). Physical characteristics of amorphous and crystalline coconut sugar powder with the addition of tricalcium phosphate (TCP) as an anticaking agent. *2020*.
- Nurhadi, B., Sukri, N., Sugandi, W. K., Widanti, A. P., Restiani, R., Nofliarnini, Z., Rezaharsanto, B., & Herudiyanto, M. J. I. j. o. f. p. (2018). Comparison of crystallized coconut sugar produced by traditional method and amorphous coconut sugar formed by two drying methods: vacuum drying and spray drying. *21(1)*, 2339-2354.
- Okoma, D. M. J., Konan, K. J. L., Assa, R. R. J. F., & Sciences, N. (2020). Vitamin and osidic composition of table sugars from the inflorescences sap of 03 coconut cultivars (Cocos nucifera L.) in Ivory Coast. *11(12)*, 1117.
- Purnomo, H. J. A. F. J. (2007). Volatile components of coconut fresh sap, sap syrup and coconut sugar. *14(1)*, 45.
- Rajamohan, T., & Archana, U. (2018). Nutrition and health aspects of coconut. In *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.)-Research and Development Perspectives* (pp. 757-777): Springer.
- Reineccius, G. (1999). Kinetics of flavor formation during Maillard browning. In *Flavor Chemistry* (pp. 345-352): Springer.
- Renjith, R., Chikku, A., & Rajamohan, T. J. A. P. j. o. t. m. (2013). Cytoprotective, antihyperglycemic and phytochemical properties of Cocos nucifera (L.) inflorescence. *6(10)*, 804-810.
- Research, T. M. (2022). Coconut Sugar Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2016 - 2024. Retrieved from <https://www.transparencymarketresearch.com/coconut-sugar-market.html>
- Sarpong, F., Jiang, H., Oteng-Darko, P., Zhou, C., Amenorfe, L. P., Mustapha, A. T., & Rashid, M. T. J. L. (2019). Mitigating effect of relative humidity (RH) on 2-furoylmethyl-amino acid formation. *101*, 551-558.
- Sarpong, F., Yu, X., Zhou, C., Hongpeng, Y., Uzoejinwa, B. B., Bai, J., Wu, B., Ma, H. J. J. o. F. M., & Characterization. (2018). Influence of anti-browning agent pretreatment on drying kinetics, enzymes inactivation and other qualities of dried banana (Musa spp.) under relative humidity-convective air dryer. *12(2)*, 1229-1241.
- Scrob, T., Hosu, A., & Cimpoi, C. J. A. (2022). Sweeteners from Different Lingonberry Jams Influence on Bioaccessibility of Vitamin C, Anthocyanins and Antioxidant Capacity under In Vitro Gastrointestinal Digestion. *11(3)*, 442.
- Shoib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., Shakeel, A., Ansari, A., & Niazi, S. J. C. p. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *147*, 444-454.
- Somawiharja, Y., Purnomo, H., Wonohadidjojo, D. M., Kartikawati, M., & Suniati, F. R. T. (2018). Indigenous technology of tapping, collecting and processing of coconut (Cocos nucifera) sap and its quality in Blitar Regency, East Java, Indonesia.
- Sudha, R., Niral, V., Hebbar, K., & Samsudeen, K. J. C. S. (2019). Coconut inflorescence sap. *116(11)*, 1809-1817.
- Sunil, L., Prakruthi, A., Prashant Kumar, P., & Gopala Krishna, A. J. I. C. J. (2020). Coconut Water Nature's miracle health drink Chemistry, Health Benefits, Packaging, Storage and Technologies: A Review. *17-25*.
- Susanti, W., Kamardiani, D. R., Pratama, I. A., & Fadilla, Q. Y. J. E. S. W. C. (2021). Coconut Sugar Quality Control Analysis of Home-Industry in Central Java. *316*, 01021.
- TOMOMATSU, A., ITOH, T., WIJAYA, C. H., NASUTION, Z., KUMENDONG, J., & MATSUYAMA, A. J. J. J. o. T. A. (1996). Chemical constituents of sugar-containing sap and brown sugar from palm in Indonesia. *40(4)*, 175-181.
- Tridge. (2022). Coconut Sugar Global import Market Share. Retrieved from <https://www.tridge.com/intelligences/coconut-sugar/production>
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Sagum, R. S., & Encabo, R. R. J. J. o. f. f. (2010). Glycemic index of commonly consumed carbohydrate foods in the Philippines. *2(4)*, 271-274.
- Veena, K., Sameena, M., Padmakumari, A., Nishanth, K., Reshma, M., & Srinivasa, G. J. I. F. R. J. (2018). Development and validation of HPLC method for determination of sugars in palm sap, palm syrup, sugarcane jaggery and palm jaggery. *25(2)*.

- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., & Shen, C.-L. J. T. J. o. n. b. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *25*(1), 1-18.
- WIRE, B. (2020). Coconut Sugar Market 2019-2023. from A Berkshire Hathaway Company <https://www.businesswire.com/news/home/20191105005665/en/>
- Xia, Q., Li, R., Zhao, S., Chen, W., Chen, H., Xin, B., Huang, Y., & Tang, M. J. A. J. o. B. (2011). Chemical composition changes of post-harvest coconut inflorescence sap during natural fermentation. *10*(66), 14999-15005.
- Ysidor, K. N. g., Assa, R. R., Konan, K. J.-L., Muriel, O. D., Prades, A., Kouassi, A., Marius, B. G. H. J. I. J. o. B. R., & Review. (2014). Glucide factors of the inflorescence sap of four coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars from Cote D'ivoire. *4*(2), 116.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. J. N. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *8*(8), 515.



Use of Nanoemulsion Technology in Dairy Industry

Binnur Kaptan^{1,a,*}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Tekirdağ Namık Kemal University, Tekirdağ, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

Review Article

Received : 24.06.2024

Accepted : 12.07.2024

Keywords:

Nanoemulsions
Milk technology
Encapsulation
Controlled release
Functional dairy products

ABSTRACT

Nanoemulsions, characterized by droplet sizes below 100 nm, are increasingly recognized for their applications in dairy technology. They are typically created using high-energy or low-energy methods and enable the encapsulation of functional food ingredients within droplets or at the interface, thereby increasing nutrient bioavailability and physical stability. The demand for nanoemulsions is increasing due to their applications in functional beverages and foods. In dairy-based products such as yogurt, cheese, and ice cream, nanoemulsions play multiple roles by stabilizing them and providing health benefits. They increase the physical stability of milk-based products, extend their shelf life, and improve sensory properties. Nanoemulsions also act as carriers for bioactive compounds, vitamins, and flavors, enriching the nutritional profile and consumer appeal of dairy products. Research on nanoemulsions is advancing due to their superior properties such as improved solubility, enhanced nutrient absorption, and controlled release capabilities. They are used in functional milk drinks, fortified milks, and milk-based supplements, contributing to the physical stability of products and offering health and nutritional benefits. Dairy products can be enriched with various functional ingredients by adding nanoemulsions. This review focuses on nanoemulsion formation and applications of nanoemulsion technology applied to dairy products within the scope of innovative approaches in the dairy industry and includes studies and results on this subject.

^a bkaptan@nku.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0002-6268-7245>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Nanoemulsions have brought about a significant shift in the development of functional foods, introducing a novel approach to food encapsulation (Kumar et al., 2018). They are viewed as one of the most promising applications of nanotechnology in the food sector, given their capacity to encapsulate, safeguard, and deliver bioactive compounds (Guttoff et al., 2015). In particular, the dairy industry has found nanoemulsion technology to be of immense value, yielding multiple benefits. The incorporation of nanoemulsions in dairy products has been associated with several improvements, including enhanced product stability, increased bioavailability of bioactive elements, and improved product functionality (McClements and Rao, 2011).

In dairy products containing fat, nanoemulsions can reduce the fat content while maintaining the creamy texture and mouthfeel. This enables the production of low-fat or fat-free dairy products that still provide consumers with the desired flavor experience. Additionally, nanoemulsions enable the encapsulation of bioactive ingredients such as vitamins, antioxidants, and probiotics into dairy products, increasing the stability and bioavailability of these

components. This enhancement in nutritional value offers greater health benefits to consumers. Nanoemulsions also help in encapsulating flavor and aroma components in dairy products, preventing their loss during processing and storage. This preservation of the desired taste profile throughout the product's shelf life enhances consumer satisfaction (Panghal et al., 2019). Moreover, the technology allows manufacturers to modify the texture and viscosity of dairy products, facilitating the production of items with desired rheological properties. This capability enables the creation of dairy products with a creamy and smooth texture, improving spreadability and mouthfeel. Furthermore, nanoemulsions increase the stability and shelf life of dairy products by preventing phase separation, microbial spoilage, and oxidation. This prolongs the freshness and quality of the product, reduces food waste, and enhances product integrity. In conclusion, the application of nanoemulsion technology in the dairy industry presents numerous opportunities for innovation, product diversification, and the development of healthier and more appealing dairy products.

In this review, nanoemulsion formation and applications of nanoemulsion technology applied to dairy products are discussed within the scope of innovative approaches in the dairy industry, and studies and results on this subject are included.

Nanoemulsion

Nanoemulsions are optically isotropic and thermodynamically stable systems consisting of two immiscible liquids (usually water, oil, and surfactants), in which one liquid is dispersed in droplets within the other (Figure 1). Emulsions with nanoscopic droplet sizes (generally in the range of 0.01–100 μm) are typically referred to as nanoemulsions (Tan and McClements, 2021). Emulsions, based on their stability and droplet size, can be categorized into nanoemulsions, microemulsions, macroemulsions, or coarse emulsions (Jose et al., 2022). The smaller droplet sizes offer distinct properties such as high surface area, excellent physical stability, quick digestibility, and increased bioavailability. Nanoemulsions are primarily classified into oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) types. In a water-in-oil emulsion, water droplets are dispersed in oil, whereas in an oil-in-water emulsion, oil particles are dispersed in water (Naseema et al., 2020). O/W nanoemulsions, which consist of oil droplets dispersed in water (Jafari et al., 2017), are ideal for creating edible coatings as they can incorporate various lipophilic compounds with antimicrobial and antioxidant properties into a hydrophilic polymeric system (Zambrano-Zaragoza et al., 2018). Conversely, W/O nanoemulsions,

like butter and cold cream (Panchal et al., 2021), contain small water droplets dispersed in oil. Besides these two types, binary emulsions such as W/O/W and O/W/O also exist but are less frequently used (Sheth et al., 2020).

Delivery systems based on nanoemulsions can enhance the water dispersibility, stability, and bioavailability of hydrophobic bioactive substances. Nevertheless, careful formulation is required to attain the desired functional attributes. Factors such as the concentration, size, charge, and physical characteristics of the nanodroplets need to be tailored for each unique application. Prior to introducing a nanoscale product, it's crucial to ascertain the physicochemical attributes of the nanoparticles and assess potential health and environmental risks. Furthermore, legal considerations, consumer perspectives, and economic implications should be factored into the development of these systems.

Components of Nanoemulsion

The components of nanoemulsions include emulsifiers, stabilizers, and texture regulators, which enhance the kinetic stability of nanoemulsions (Gupta et al., 2016; Wilson et al., 2021).

The oil phase plays a critical role in nanoemulsions. Lipophilic core materials consist of tri-, di-, or monoacylglycerols, free fatty acids, essential oils, and waxes (Umaraw and Verma, 2017). Sunflower oil, corn germ oil, and soybean oil are commonly used due to their low cost, non-toxicity, and abundance in nature (Sridhar et al., 2021).

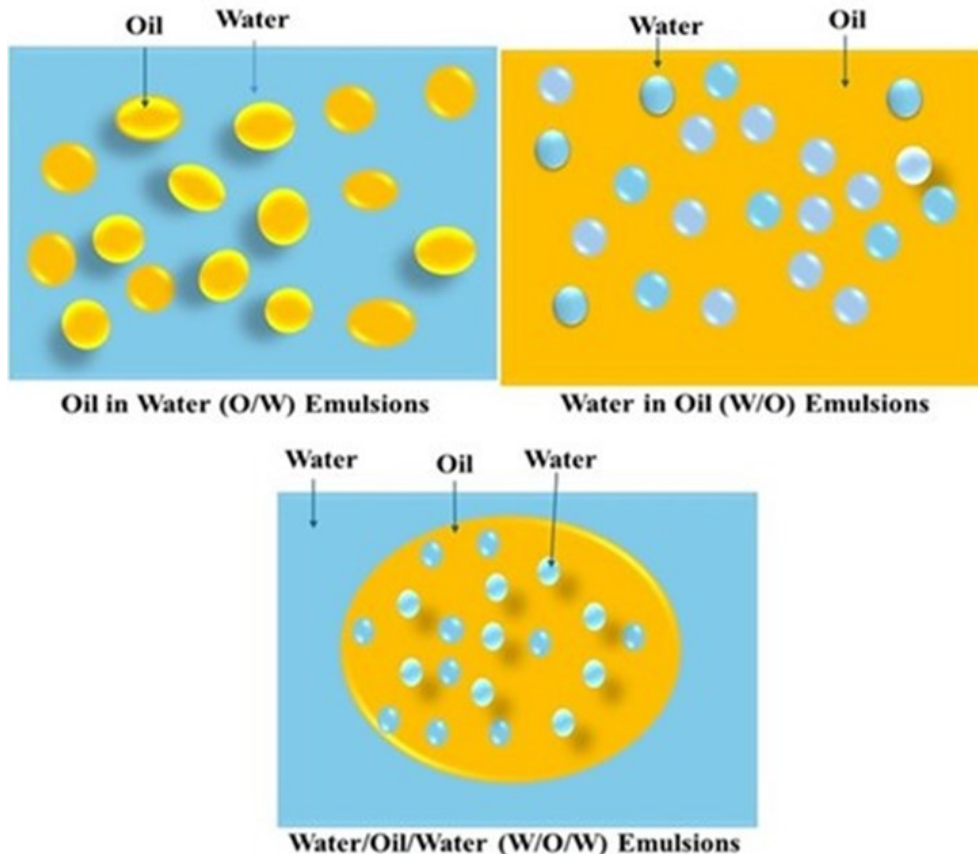


Figure 1. Different emulsion-based delivery systems (Source: Teo et al. (2022))

The aqueous phase in nanoemulsions contains various polysaccharides, co-solvents, salts, proteins, and core compounds. These components alter the physicochemical properties of nanoemulsions by affecting the pH, ionic strength, viscosity, polarity, phase behavior, and interfacial tension of the water phase.

Polysaccharides play a significant role in enhancing the stability of nanoemulsions. Amphiphilic polysaccharides such as modified celluloses, modified alginates, galactomannans, modified starches, pectins, and gum arabic are often used as emulsifiers to provide stability by increasing viscosity (Versino et al., 2016). These polysaccharides are low-cost and abundant in nature. When dissolved in water, they form strong hydrogen bonds and have minimal effects on the taste or appearance of food. However, their high water vapor permeability and solubility may limit their use in nanoemulsions.

Emulsifiers reduce the interfacial tension between oil and water, enhancing droplet formation and stability. Phospholipids, polysaccharides, synthetic small molecule surfactants, and proteins are commonly used. Proteins interact with both the water and oil phases, acting like surfactants and increasing the stability of nanoemulsions. Natural emulsifiers are preferred for food safety and cost considerations (Azrini et al., 2019; Cassiday, 2016; Flores-López et al., 2016; Guttoff et al., 2015).

Surfactants adsorb at the oil-water interface, providing stability to nanoemulsions. Lecithin, a commonly used surfactant, prevents droplet aggregation. Co-surfactants

help form smaller droplets by reducing surface tension. However, they are not sufficient for stability on their own, so co-surfactants are added. Commonly used co-surfactants include medium or short-chain alcohols and polyols similar to ethanol (Jin et al., 2016). Additionally, long-chain triacylglycerols, mineral oils, ester waxes, alcohols, and polyols can enhance the properties of nanoemulsions, though they are not essential for their formation (Jin et al., 2016).

Methods of Nanoemulsion Formation

Nanoemulsions can be prepared using either high-energy or low-energy methods (Salem et al., 2019). The preparation methods influence characteristics such as droplet size and the stability of the emulsion. There is no difference in the properties of the final dispersion between nanoemulsions prepared using high shear (external energy, dispersion methods) or stored chemical energy within the system (condensation methods) (Gutierrez et al., 2008). Droplet size varies depending on the components, operating conditions, and preparation methods. The emulsification process involves the breaking down of droplets into smaller fragments, the adsorption of surfactants, and the collision of droplets. The kinetics of adsorption also affect the stability and droplet size of nanoemulsions (Silva et al., 2015). Some commonly used high-energy or low-energy nanoemulsion methods and their applications are summarized in Table 1.

Table 1. High-energy or low-energy nanoemulsion methods and their applications

Preparation Method	Oil Phase	Surfactant/Co-surfactant	Bioactive Component	References
Membrane Emulsification	Methylene chloride	Tween-20/ Tween®80/Polivinil Alkol	Flurbiprofen	Oh et al. (2011)
Membrane Emulsification	Medium-Chain Triglycerides	Tween-80	Vitamin E	Laouini et al. (2012)
High-pressure homogenization	Corn oil	Tween-20, SD-S, sodium caseinate, and β -lactoglobulin		Qian and McClements (2011)
Phase Inversion Temperature	Orange oil	Tween-20	β -Carotene	Qian and McClements (2011)
Ultrasonic Emulsification	Basil oil	Tween-80A	Basil oil	Ghosh et al. (2013)
Ultrasonic Emulsification	Sunflower oil	Tween-80	Protein (β -lactoglobulin) and Anionic Polysaccharide (Apricot Gum)	Shamsara et al. (2015)
High-Pressure Homogenization	Oil-in-Water	Tween-20 gum arabic, sodium caseinate	<i>Nigella sativa</i> oil	Mohammed et al. (2020)
Spontaneous Emulsification Method	Lemon oil	Tween-80	Polyunsaturated (ω -3) oils	Gulotta et al. (2014)
Spontaneous Emulsification	Medium chain Triglycerides	Tween-80	Vitamin D	Guttoff et al. (2015)
Nanoemulsion	Sunflower oil	Tween-80	Vitamin D3	Hendy (2023)
Spontaneous Emulsification	Medium-chain Triglycerides	Tween-20, 40, 60, 80	Vitamin E	Saberi et al. (2013)
Spontaneous Emulsification	Coconut oil	Tween-80	Cinnamon oil	Yıldırım et al. (2017)
Spontaneous Nanoemulsification	Water	Tween-20,	Cinnamon essential oils	Arul Raj et al. (2024)
Phase inversion composition	Hydrogenated polyisobutane	Polietilen Glikol-400 Monoizostearat	–	Sonneville-Aubrun et al. (2009)
Phase inversion composition	n-Dodecane	Hexanol or Sodium dodecyl sulfate	–	Solè et al. (2010)
Ultrasonic Emulsification	Sodium Alginate	Tween-80	<i>Myrtus communis L</i>	Polat Yemiş et al. (2022)

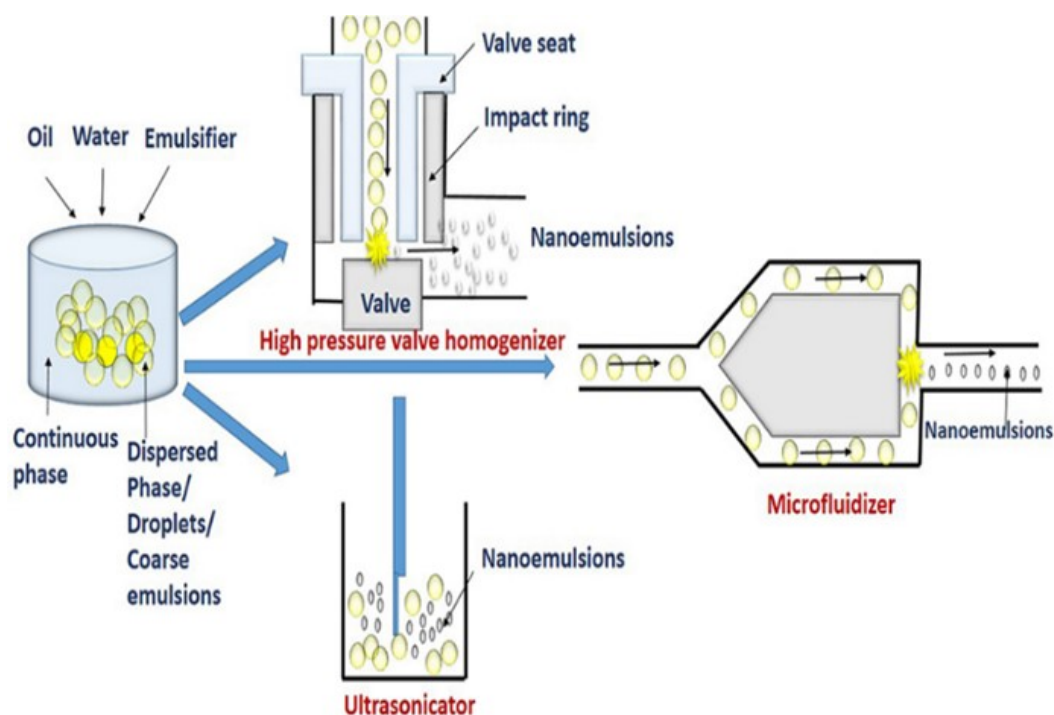


Figure 2. High-Pressure Homogenization (HPH), Microfluidization, and Ultrasonication Methods (Source: Aswathanarayan & Vittal 2019).

High-Energy Approaches

High-energy methods involve the use of mechanical devices such as high-pressure valve homogenizers, microfluidizers, and ultrasonicators (Figure 2). These devices are utilized to disperse macroemulsions into small droplets by generating powerful disruptive forces (Maali & Hamed Mosavian, 2013).

High-Pressure Homogenization Method

High-pressure homogenizers are frequently utilized in the creation of nanoemulsions. These traditional devices typically function at pressures between 50 and 100 MPa (Solans et al., 2005). The process of high-pressure homogenization involves subjecting a liquid product to high shear stress, which results in the formation of extremely fine emulsion droplets. This shear stress is produced by the sudden constriction of the flow under high pressure through valves (Augustin & Sanguansri, 2006; Saffarionpour, 2019). This method has been used to produce nanoemulsions of various, including carvacrol, tangerine, bergamot, and lemon.

Ultrasonication

Ultrasonication employs high-intensity and high-frequency ultrasonic waves to mix and disrupt oil and water phases, creating nanoemulsions with small droplets (Sanguansri & Augustin, 2006; Leong et al., 2009). Desktop ultrasonic devices, containing a probe with piezoelectric crystals, convert electrical voltage into mechanical vibrations, generating sound waves that produce intense disruptive forces through cavitation, turbulence, and surface waves (Kentish et al., 2008). This process operates on two main mechanisms: dispersing the oil phase into droplets and collapsing microbubbles, resulting in sub-micron-sized droplets exposed to high shear rates (Shamsara et al., 2015).

Nanoemulsions produced by ultrasonication typically have broad and bimodal size distributions (Jafari et al., 2017). Ultrasonication has been successfully used for eugenol-loaded nanoemulsions for wound treatment (Ahmad et al., 2018) and anise oil nanoemulsions with antimicrobial properties (Ghazy et al., 2021). Studies have shown that increasing ultrasonication time reduces droplet diameter in celery oil nanoemulsions, enhancing their anticancer activity (Nirmala et al., 2020). Significant variables in the nanoemulsification process include the concentration of dissolved gas, hydrostatic pressure, apparatus configuration, and temperature. Commercial homogenizers have been developed for large-scale applications (Singh et al., 2017). Although ultrasonication uses less energy compared to other high-energy techniques, probe contamination remains a significant disadvantage.

Microfluidization

Microfluidization distinguishes itself from high-pressure homogenization through the use of a microchannel that provides optimal cavitation, shear, and impact forces for dispersion, size reduction, and emulsion production (Sanguansri & Augustin, 2006). Microfluidization (colloid mill) processes and similar fluid-based technologies benefit from the flow-induced shear of liquids, hot melts, and other soft aggregates (Fig 2). This process achieves the dispersion of processed materials at the nanoscale (Acosta, 2009). Prior to homogenization with a microfluidizer, the aqueous phase and oil phase are typically combined using a high-speed homogenizer to form a coarse emulsion. This coarse emulsion is then passed through the microfluidizer to obtain a stable nanoemulsion (Koroleva & Yurtov, 2012). Nanoemulsions of black seed oil O/W (Foo et al., 2022) and limonene O/W (Hidajat et al., 2020) have been successfully processed using microfluidization.

Low-Energy (LE) Methods

Low-energy (LE) methods rely on the spontaneous formation of small oil droplets from incompatible oil/water/emulsifier mixtures through controlled changes. LE methods are characterized by changes in the physicochemical factors of the mixture composition, such as temperature, solubility, and environmental conditions. These factors significantly influence the formation of nanodroplets in mixed systems containing oil, water, and surfactants (Salvia-Trujillo et al., 2017). Commonly, three fundamental low-energy methods are used in nanoemulsion synthesis: Phase Inversion Temperature (PIT), Phase Inversion Composition (PIC), and Spontaneous Emulsification Method (Figure 3). Mehrnia et al. (2015) reported two main methods in the development of nanoemulsions with LE methods: phase inversion and spontaneous emulsification. These methods use very little energy, thus preserving heat-sensitive substances without degradation (Anton & Vandamme, 2009). The interest in adopting LE methods in production and application stems from their affordability, simple applicability, non-destructive characteristics, and energy efficiency (Gulotta et al., 2014; Komaiko & McClements, 2016;).

Phase Inversion Temperature (PIT)

The PIT method involves manipulating the temperature to induce phase inversion, resulting in the formation of stable nanoemulsions (Figure 3). While some researchers do not consider this method valid for the production of nanoemulsions, others have adopted it. The method is based on the changes in solubility of polyoxyethylene type non-ionic surfactants with temperature (Izquierdo et al., 2002). The dehydration of the polymer chain causes these surfactants to become more lipophilic as the temperature increases (Solans et al., 2005). However, this technique is extremely expensive and therefore not suitable for industrial use (Santana et al., 2013).

Phase Inversion Composition (PIC)

Similar to PIT, the PIC method focuses on altering the composition of the emulsion system to achieve phase inversion. This method involves a gradual dilution with water or oil, and this composition is optimized at a certain temperature (Figure 3). This phase change is driven by the Gibbs free energy of the emulsion, resulting in the spontaneous inversion of the curvature of the surfactant from positive to negative (Sonneville-Aubrun et al., 2009). This method is inexpensive, does not require the application of organic solvents, and is therefore thermodynamically stable. Using the phase inversion composition technique, safe-to-consume nanoemulsions have been prepared, supported with Vitamin E acetate, with a standard particle size of 40 nanometers. This process has been proven to be more effective than microfluidization in producing nanoemulsions with high surfactant concentrations (Shakeel et al., 2009).

Spontaneous Emulsification (Self-Emulsification)

Spontaneous emulsification, also known as solvent diffusion emulsification, facilitates emulsion formation through diffusion driven by a chemical potential gradient (Espitia et al., 2019; Solans et al., 2016). Typically, oil-in-water nanoemulsions are formed by gradually adding water to a solution of oil and surfactant (Kelman et al., 2007; Saberi et al., 2013). This method is employed in distributing bioactive food components, beginning with the combination of the organic phase (oil and surfactant) with the aqueous phase (co-surfactant and water) (Kheawfu et al., 2018). As the microemulsion phases break down, fine oil droplets form spontaneously (Anton et al., 2008). Solvents can accelerate this process, even without surfactants (Komaiko & McClements, 2016).

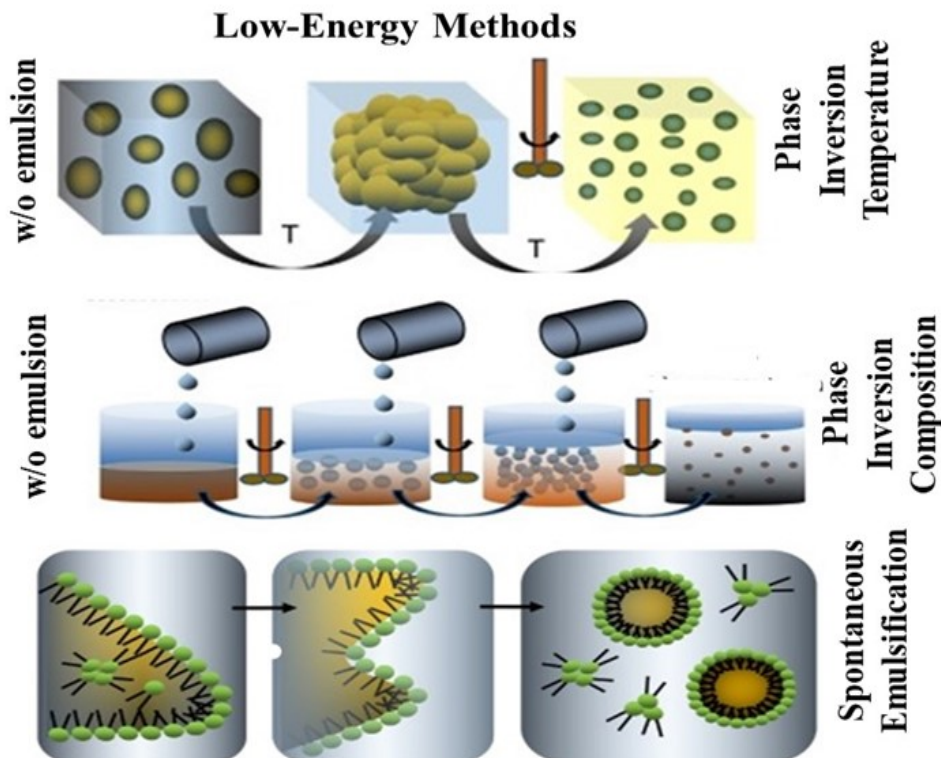


Figure 3. Phase Inversion Temperature, Phase Inversion Composition, and Spontaneous Emulsification (Source: Rai et al., 2018)

This method can produce nano or microemulsions without regard to kinetics and is advantageous because it does not require special equipment, allowing for nanoemulsion development under ambient conditions (Chen et al., 2016). However, the presence of solvents and the limited amount of the oil phase are notable disadvantages (Maali & Mosavian, 2013; Subasi et al., 2017). Studies have demonstrated the advantages of nanoemulsions containing vitamin E acetate, vitamin D, and omega-3 fish oil, which maintain structural stability at approximately 37 °C and oxidative stability for 14 days at 55 °C (Guttoff et al., 2015; Walker et al., 2015). Despite being a relatively new industrial application, spontaneous emulsification shows potential as an economical approach to nanoemulsion production.

An Overview of the Methods

Each method has its own advantages and disadvantages, and the choice of method will depend on the specific requirements of the application. When choosing a method it is important to consider factors such as cost, energy efficiency and the nature of the materials being processed. The high pressure homogenization method creates extremely fine emulsion droplets by subjecting a liquid product to high shear stress. Its main advantage is the ability to form fine emulsions, but this can be energy intensive. While the ultrasonication method uses less energy than other high-energy techniques, a significant disadvantage is the risk of probe contamination. The microfluidization process enables the dispersion of engineered materials at the nanoscale, which can be advantageous in some applications. It is useful in protecting heat-sensitive materials from deterioration in low energy methods. They are affordable, easy to apply, non-destructive and energy efficient. Despite the effectiveness of the phase inversion temperature method, this technique is extremely expensive and therefore not suitable for industrial use. The phase inversion compounding method has proven to be more effective than microfluidization in producing nanoemulsions with high surfactant concentrations. Although self-emulsification is a relatively new industrial application, it shows potential as an economical approach to nanoemulsion production.

Applications of Nanoemulsions in the Dairy Industry

Nanoemulsions have significant potential to meet the vast market demand through their possible applications in the beverage, confectionery, and food packaging industries (Dasgupta & Ranjan 2018). Similarly, nanoemulsion technology offers a variety of applications in the dairy industry. It provides several advantages, such as enhanced stability of dairy products, improved bioavailability, and increased functionality. The applications of nanoemulsion technology in the dairy industry include:

Fat Reduction: Nanoemulsions can maintain the creamy texture and mouthfeel of dairy products like milk, cheese, yogurt, and ice cream while reducing their fat content (Martins et al., 2007; Unilever, 2011). Fat droplets can be encapsulated at the nanoscale, allowing for the creation of low-fat or fat-free products.

Enhanced Nutrient Delivery: Nanoemulsions can encapsulate bioactive compounds such as vitamins, antioxidants, and probiotics. This enhances their stability and bioavailability in dairy products, enriching the products and offering greater health benefits to consumers.

Improved Flavor Encapsulation: Nanoemulsions can encapsulate flavors and aromas, preventing their degradation and loss during the processing and storage of dairy products. This ensures the preservation of the desired flavor profile throughout the product's shelf life, increasing consumer satisfaction.

Texture Modification: Nanoemulsions can be used to alter the texture and viscosity of dairy products. This facilitates the creation of products with creamy and smooth textures.

Extended Shelf Life: Nanoemulsions can increase product stability and shelf life by preventing phase separation, microbial spoilage, and oxidation. This reduces food waste and maintains product quality.

Functional Content Delivery: Nanoemulsions can enable targeted delivery and release of functional components such as omega-3, prebiotics, and bioactive peptides. This facilitates the development of dairy products with enhanced functional properties that promote health.

Reduced Ingredient Usage: Nanoemulsions allow for the reduction of components such as stabilizers and emulsifiers in dairy product formulations, leading to cleaner labels and potentially lowering production costs.

In conclusion, nanoemulsion technology presents significant opportunities in the dairy industry for fat reduction, nutrient distribution, flavor encapsulation, texture modification, shelf life extension, functional content delivery, and reduction of production costs.

Nanoemulsion Application in Dairy Products

Dairy products are a significant part of the food industry. Nanoemulsion technology is effectively applied in various areas, such as extending the shelf life of dairy products, enhancing nutritional value, improving bioavailability, carrying functional components, and developing new products (Table 2). This technology offers a versatile and effective method to enhance the quality, stability, and functionality of milk and dairy products, representing a significant advancement in the dairy industry.

Milk

The potential of milk and dairy products to increase micronutrient content and strengthen resistance to diseases is supported by various studies. Lipid-based nanoemulsions can improve the integration of essential micronutrients such as vitamins A, D, and E into foods by increasing the solubility and bioavailability of lipophilic vitamins. Milk, especially when containing vitamin D3 and calcium, has positive effects on aging and bone health, while fat-soluble vitamin D supports calcium absorption and bone formation. However, because vitamin D is not water-soluble, low-fat milk and dairy products do not naturally contain this vitamin. Therefore, lipid nanoparticles may increase the nutritional value of dairy products by facilitating the transport of substances such as vitamin D.

Table 2. Application of nanoemulsion technology in milk and dairy products

Dairy Product	Nanoemulsion Methods	Delivery Systems	Bioactive Component	Effect on the Product	References
Skim milk, Semi fat milk (%2 fat) Full fat milk (%4 fat)	Microprocessor homogenizer	Oil-in-Water nanoemulsion	<i>Thymus capitatus</i> essential oil	Inactivation of <i>L. monocytogenes</i>	Xue et al. (2013)
Driking milk	High-pressure homogenizer	Oil-in-Water nanoemulsion	Curcumin	Lower lipid oxidation Effective oxygen scavenging activity	Joung et al. (2016).
Pasteurized and raw milk	High pressure microfluidizer	Oil-in-Water nanoemulsion	<i>Thymus capitatus</i> essential oil	Protective effect of against pathogenic bacteria	Ben Jemaa et al. (2017)
Skim Full fat milk	Microprocessor homogenizer	Solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsions	Spray dried lactase powder	Potential to carrier lactase in milk for lactose-intolerant consumers	Zhang and Zhong (2017)
Pineapple ice cream	Emulsion inversion point	Oil-in-water	Curcumin	A suitable alternative to reduce the use of artificial dyes.	Borin et al. (2018)
Ice-cream	High-pressure homogenizer	Oil-in-Water nanoemulsion	<i>Nigella sativa</i> oil	Improved the ice-cream physical properties and consumer acceptability	Mohammed et al. (2020)
Ice-cream	Ultrasonication	Oil-in-water	Moringa seed oil (omega-3 content)	Enhanced antioxidant	Abdelraouf et al.(2023)
Gelato-type ice cream	High pressure homogenization	Oil-in-water	β -carotene	Increasing yield by increasing volume.	Borba et al. (2023)
Frozen yogurt	Ultrasonication	Oil-in-water	γ -oryzanol	Natural antioxidant content	Alfaro et al. (2015)
Yogurt	Low-energy emulsification	Oil-in-water	γ -oryzanol	Maximum retention of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid	Zhong et al. (2018)
Low-fat set yogurts	High-pressure homogenizer	Water -in-oil	Docosahexaenoic acid and Eicosapentaenoic acid	Significant effect on the retention of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid	Bakry et al. (2019)
Stirred yogurt	Low energy spontaneous emulsification	Water -in-oil	Essential oil (Lemongrass, Spearmint, Cloves and, Cinnamon)	Naturally flavored yogurt	Salama et al. (2022)
Stirred yogurt	Ultrasonication	Water -in-oil	Virgin olive oil	a good carrier for synbiotic bacteria and antioxidant	El-Sayed et al. (2022a)
Yogurt	Ultrasonication	Oil-in-water	Rosehip oil (Omega-3 fatty acids)	Potential for preserving linoleic acids, increasing the stability of omega-3 fatty acids and masking yoghurt sourness.	Rao et al. (2023)
Lab-manufactured yogurt	High-pressure homogenization	Oil-in-water	Cinnamaldehyde	anti- <i>H. pylori</i> activity	Abdelhamid et al. (2023)
Yogurt	High-pressure homogenization	Oil-in-water	<i>Oleoresin capsicum</i> (Capsaicin)	With its increasing health benefits, capsaicin has the potential to be used as a commercial product.	Ko et al. (2024)
Minas Padrão cheese	Phase inversion temperature	Oil-in-water	Essential oil of oregano	Antifungal effect (<i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium</i> sp)	Bedoya-Serna et al. (2018)
White soft cheese	High-pressure homogenization	Oil-in-water	Cumin essential oil	Antimicrobial activity (<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>S.typhimurium</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>)	El-Sayed and El-Sayed (2021)
Herbal soft cheese	Low energy spontaneous emulsification	Water -in-oil	<i>Coriandrum sativum</i> L. seed extract	Bacteriostatic action against <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. flavus</i>	El-Sayed et al. (2022)
Fresh Kasar cheese	Ultrasonication	Water -in-oil	<i>Myrtus communis</i> essential oil	Antibacterial activity against <i>L. monocytogenes</i>	Polat Yemiş et al. (2022)
Soft Cheese	Ultrasonication	Oil-in-water	Curcumin	Improved sensory properties, Antibacterial activity (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bagale et al. (2023)
Karish cheese	Ultrasonication	Oil-in-water	VD3	Cheese fortified with VD3	Hendy, (2023)
Processed cheeses	Low energy spontaneous emulsification	Water -in-oil	<i>Laurus nobilis</i> L extract	Enrichment of cheese with agents that provide protection against hyperhomocysteinemia in Ehrlich ascites carcinoma.	Hussein et al. (2023)
Grated mozzarella cheese	Microfluidizer	Oil-in-water	Cinnamaldehyde	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium crustosum</i>	Ghada et al. (2024).

Gruenwald (2009) stated that skim milk is a poor source of vitamins, and fortifying it with vitamin D3 increases calcium absorption in humans. In one study, patients with vitamin D deficiency were administered a diet program in which they were given vitamin D-enriched milk with different lipid distributions for 6 weeks. At the end of the research, it was observed that olive oil significantly increased the vitamin D content in the patients' serum. This study supports the use of olive oil as a lipid component in vitamin D-fortified milk beverages (McCourt et al., 2021). In a study in which the essential oil obtained from the *Thymus capitatus* (thyme) plant (main component 76.1% carvacrol) by hydrodistillation was added to pasteurized and raw milk (Ben Jemaa et al., 2017), it was determined that thyme essential oil was effective in preventing spoilage. Additionally, adding thyme essential oil to raw milk extended the shelf life of milk by delaying the development of contaminating pathogenic bacteria and the oxidation of milk fat. In a study examining the antimicrobial activity of thymol, Xue et al. (2013) observed that the nanoemulsion form of thymol was more effective than free thymol and significantly reduced *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), especially in 2% fat and whole milk. Additionally, nanoemulsions in skim milk were found to reduce *Escherichia coli* (*E. coli*) below the limit of detection. Stable curcumin nanoemulsions were synthesized by high-pressure homogenization and added to commercial milk samples. These nanoemulsions have been reported to show effective oxygen scavenging properties in commercial milk samples and remain stable for up to one month at room temperature (Joung et al., 2016). The potential of nanoemulsion technology for controlled lactose hydrolysis in milk was investigated. Freeze-dried capsules from lactase-containing S/O/W emulsions demonstrated gradual release of lactase into dairy products and achieved controlled lactose hydrolysis over a three-week storage period (Zhang & Zhong, 2017). These findings highlight the promise of nanoemulsion techniques in enhancing the quality, stability, and utility of milk-based and dairy items. Nanoemulsions could augment the nutritional content of dairy goods, possibly exert beneficial effects on human wellness, and bolster disease resistance. This technology is seen as an important tool for innovative applications in the dairy industry sector.

Ice Cream

Ice cream is defined as a dairy product obtained by processing a mixture of sweeteners, stabilizers, emulsifiers, colorants, flavors, and taste substances with air in special equipment called freezers. Typically, the size of ice crystals and air bubbles varies between 20 and 50 μm . While fat globules usually form a coating around air bubbles, proteins or emulsifiers form a coating around fat globules. Different equipment and techniques are used to develop nanoemulsions in ice cream production. Curcumin is a polyphenolic compound with various health benefits; these include antioxidant, anti-inflammatory, antitumorigenic, anticoagulant, antibacterial, and anticarcinogenic effects. However, the use of curcumin as a functional component is limited because it shows a tendency to degrade in the presence of water solubility, biological availability, absorption in the gastrointestinal system, alkaline pH, high temperature, and light (Aditya et

al., 2014). This problem can be resolved by including curcumin in the nanoemulsion formulation and using it as a carrier. Ice cream is a product loved by almost every age group and season; therefore, it could be a suitable carrier for encapsulated curcumin. Nestle and Unilever have developed nanoemulsions in ice creams to reduce the fat content from 16% to 1% (Martins et al., 2007; Unilever, 2011). Nanoemulsions have also been utilized to improve the consistency and texture of ice cream. It has been indicated that nanoemulsions prepared using antioxidant-rich moringa seed oil and whey proteins have been successful in ice cream production and provided functional properties enriched with omega-3 content (Abdelraouf et al., 2023). The addition of β -carotene and corn oil nanoemulsions to gelato-type ice cream has been found to increase volume expansion, thereby enhancing gelato yield (Borba et al., 2023).

A research study focused on creating ice cream enriched with *Nigella sativa* oil (NSO) nanoemulsion at different ratios (0% control, 3%, 5%, and 10%), it was stated that when the NSO nanoemulsion was stabilized with gum arabic, sodium caseinate, and Tween-20, the 10% nanoemulsion showed the highest stability in ice cream (Mohammed et al., 2020).

Yogurt

Yogurt is a fermented dairy product that includes sweeteners, flavors, and starter bacterial cultures. Due to its extensive health benefits, yogurt is frequently incorporated into daily diets. Dairy products, particularly yogurt, are considered an ideal medium for functional ingredients such as essential oils and probiotic bacteria. Nanoemulsion technology enhances the solubility of lipophilic bioactive compounds and oils in water, thereby increasing their effectiveness. Accepted as the most advanced encapsulation method for lipids, nanoemulsion technology is employed to improve quality maintenance and bioavailability in food systems. High-energy methods like sonication and high-pressure optimization are commonly used in the preparation of oil nanoemulsions. The introduction of γ -oryzanol and fish oil-enriched nanoemulsions into yogurt has been shown to reduce peroxide value, syneresis, and acidity gradually while maintaining higher levels of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) (Zhong et al., 2018). This nanoemulsion preserves the antioxidant properties of γ -oryzanol, contributing to yogurt's health benefits. Adding nanoemulsion rice bran oil—a natural antioxidant source containing α -tocopherol, tocotrienol, and γ -oryzanol—to frozen yogurts significantly increases the natural antioxidant content, enhancing the product's nutritional profile (Alfaro et al., 2015). Salama et al. (2022) developed functional yogurt using nanoemulsions of peppermint, lemongrass, clove, and cinnamon essential oils with lactic acid bacteria. A study reported that adding extra virgin olive oil nanoemulsion and symbiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) encapsulated in maltodextrin microcapsules to yogurt increased the viability of probiotics and provided high antioxidant activity (El-Sayed et al., 2022a). In low-fat set yogurt enriched with tuna and peppermint oil microemulsions, peppermint oil was found to enhance oxidative stability, mask the fish odor, and improve

sensory properties. The microemulsions also maintained the stability of DHA and EPA (Bakry et al., 2019). A rose oil nanoemulsion prepared by ultrasonication has been effective in masking the sour taste in yogurt by preserving linoleic acid and enhancing the stability of omega-3 fatty acids (Rao et al., 2023). In research testing the most effective probiotic strains and nanoemulsions against *Helicobacter pylori*, the combination reduced the count of *H. pylori* by 3.9 log and showed a low inhibitory effect on other microorganisms (Abdelhamid et al., 2023). When a nanoemulsion, created to increase the stability of capsaicin and mask its strong taste and odor, was used in the production of capsaicin-enriched yogurts, this method demonstrated its potential in the production of yogurt as a new nutritionally enriched food (Ko et al., 2024).

Cheese

Recent developments in dairy technology have centered on improving the nutritional value and extending the shelf life of cheese through the integration of nanoemulsions. These nanoemulsions act as carriers for essential nutrients, such as Vitamin D3, which can be synthesized from exposure to sunlight or added to foods as a fortification. The addition of emulsifying agents such as vitamin D3 and milk proteins during the water-in-oil emulsion phase has been shown to improve vitamin retention in cheese. For example, Karish cheese fortified with Vitamin D3 nanoemulsion has been identified as an effective approach to addressing vitamin D deficiency, with the application method, particularly the spraying technique, significantly increasing vitamin retention and improving the cheese's overall quality (Hendy, 2023). Minas Padrão cheese was studied for its antifungal properties when enriched with nanoemulsion-encapsulated *Origanum vulgare* (oregano) essential oil. The nanoencapsulation was found to have inhibitory effects against fungi such as *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., and *Penicillium* sp., with result varying based on the encapsulation (Bedoya-Serna et al., 2018).

The use of antifungal nanoemulsions containing natural essences encapsulated with whey protein isolate and maltodextrin has been effective in extending the shelf life of grated mozzarella cheese. This promising approach could provide an antifungal preservation method for cheese and offer an alternative to traditional preservatives like natamycin (Ghada et al., 2024).

Nanoemulsion-based coatings incorporating oregano essential oil have been employed to prolong the shelf life of low-fat sliced cheese by reducing *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) populations and inhibiting the growth of psychrophilic bacteria, yeast, and mold during storage. The coatings' composition, including sodium alginate and mandarin fiber, preserved the cheese's nutritional properties and improved its appearance (Artiga-Artigas et al., 2017).

El-Sayed and El-Sayed (2021) reported that the nanoemulsion of cumin essential oil (CEO) added to white soft cheese exhibited antimicrobial activity against *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus flavus* (*A. flavus*).

Active films containing marjoram essential oil have been effective in controlling microbial spoilage (Mohammadi Jarchelo et al., 2022). Polat Yemiş et al. (2022) have demonstrated that the application of nanoemulsion coatings, which incorporate myrtle essential oil, are successful in suppressing the proliferation of *L. monocytogenes* and found to maintain the physicochemical characteristics of the cheese, indicating their potential utility in food preservation.

Application of the nanoemulsion form of coriander seed ethanolic extract showed bacteriostatic effects against *S. aureus*, *E. coli*, and *A. flavus*, delayed the growth of yeast and mold, and also positively affected the microbiological, chemical, and sensory properties of soft cheese (El-Sayed et al., 2022). The impact of stabilized curcumin nanoemulsions (CUNE) on cheese was evaluated, revealing that CUNE addition improved sensory properties by 150% and extended shelf life without altering the cheese's uniform porosity distribution, thus adding value to the dairy industry (Bagale et al., 2023).

The protective effect of cheese enriched with *Laurus nobilis* L. extract nanoemulsion against hyperhomocysteinemia in an Ehrlich acid carcinoma model was also assessed. The enriched cheese reduced serum levels of Hcy, TNF- α , TBARS, and MMP-9 while increasing SOD activity and Bcl-2 levels, thereby mitigating oxidative stress, inflammation, and apoptosis (Hussein et al., 2023). In another study, cheese safety was enhanced using probiotic cell pellets (LCP) or cell-free extracts (CFS) to improve cheese characteristics. Six CFS probiotics were evaluated for their antifungal properties against toxigenic fungi, and the most effective CFS was selected for nanoemulsion coating. *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) CFS demonstrated potential for reducing aflatoxins. Uncoated cheese showed higher yeast and mold counts compared to processed cheeses. No *Aspergillus* growth was observed in LCP-CFS-coated cheese for up to 40 days. Coating cheese with *L. rhamnosus* nanoemulsion provided antifungal and antiaflatoxigenic properties that could extend the cheese's shelf life (Ibrahim et al., 2023). Innovative biocomposite materials based on Moringa nanoemulsion and chitosan/whey protein concentrate were developed for coating Ras cheese (Adel et al., 2023).

Overall, these studies highlight the potential of nanoemulsions as natural food preservatives and functional food ingredients, capable of enhancing the safety, nutritional value, and sensory qualities of cheese while also offering health benefits and extending shelf life. The use of nanoemulsions in cheese fortification represents a promising direction for the dairy industry, aiming to meet consumer demands for healthier and longer-lasting dairy products.

Advantages and Disadvantages of Nanoemulsion Technology Applications in the Dairy Industry

Advantages

Nanoemulsion technology represents one of the significant advantages in the dairy industry. It increases the stability of bioactive components added to dairy products, enhances bioavailability, and facilitates their absorption by the body. It helps preserve the nutritional value of products

by protecting sensitive components, especially omega-3 fatty acids, from oxidation. Additionally, nanoemulsions extend the shelf life of dairy products and reduce microbial spoilage. Nanosized emulsion droplets can inhibit microbial growth and slow oxidative degradation. This improves food safety because the active antimicrobial substances in the emulsion droplets can inhibit the growth of pathogenic microorganisms and thus help prevent foodborne diseases. Nanoemulsions also improve the taste, aroma, and texture of dairy products, making them more attractive to consumers and potentially increasing market share. Although some bioactive ingredients are insoluble in water, nanoemulsion technology can provide a homogeneous distribution by increasing their solubility and distribution in dairy products. Nanoemulsions facilitate the development of new products and aid in the production of functional foods..

Disadvantages

Nanoemulsions present potential opportunities in the food industry, including dairy products. However, to fully exploit their advantages, various disadvantages must be considered. The preparation of nanoemulsions necessitates specific methods, leading to high energy consumption and significant costs. This requirement for specialized equipment, such as high-pressure homogenizers, may restrict their broad application. Ostwald ripening is also a fundamental stability issue (Ayata, 2010). The lack of comprehensive research on the potential health risks associated with nanoparticles contributes to consumer hesitation and distrust towards this technology.

The production of nanoemulsions involves intricate processes that demand high pressure and energy, which can complicate the management of the production process. Environmental concerns stem from the not-yet-fully understood impacts of nanoparticles on the environment. Incomplete legal and regulatory frameworks for nanoemulsions generate uncertainty for producers, potentially delaying their introduction to the market. Addressing these disadvantages and advancing further research and development are crucial to harnessing the full potential of nanoemulsion technology. It is important to present this information clearly and professionally, maintaining the use of the present tense throughout the passage for consistency.

Conclusion

In conclusion, findings from various studies highlight the significant potential of nanoemulsion technology in the dairy industry.

These innovative approach methods in the dairy industry can offer consumers both healthier and more nutritious products by increasing the bioavailability of nutrients.

The increased stability and extended shelf life facilitated by this technology could expand the reach of dairy products and allow a broader demographic group to benefit from these healthy alternatives. Researchers are constantly developing new strategies to reduce the production costs of nanoemulsions and reduce their environmental impact. The use of emulsifiers and stabilizers derived from renewable sources marks an

important step towards making this technology more sustainable and environmentally friendly. Additionally, extensive research on the safety and effectiveness of nanoemulsions will increase consumer confidence and accelerate industrial adoption. Looking ahead, nanoemulsion technology can offer innovative solutions that extend beyond the dairy industry to personal care, pharmaceuticals and many other sectors, thereby improving various aspects of our lives. Implementation of this technology in accordance with sustainability and safety norms can mark a new era in healthy living and promise significant advances.

Declarations

Conflict of Interest

The author declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this review.

Ethics Committee Approval

Ethics committee approval is not required.

Funding

No financial support was received for this study.

References

- Abdelhamid, S. M., Edris, A. E., & Sadek, Z. (2023). Novel approach for the inhibition of *Helicobacter pylori* contamination in yogurt using selected probiotics combined with eugenol and cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Chemistry*, 417, 135877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135877>
- Abdelraouf, W., Mattr, A., El-Desouky, S., & Elrefaey, A. (2023). Preparation and characterization nanoemulsion moringa oil by whey protein and application in ice cream as a food model. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 0(0). <https://doi.org/10.21608/ejds.2023.207208.1012>
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(3-15). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.002>
- Adel, K., Youssef, A., Awad, R., & Gamal El Din, A. (2023). Development of CS/WPC/MO-NE bionanocomposites for coating Ras cheese based on Moringa essential oil nanoemulsion. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.21608/ajar.2022.177011.1104>
- Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P. S., & Ko, S. (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 115-121.
- Ahmad, N., Alam, M. A., Ahmad, F. J., Sarafroz, M., Ansari, K., Sharma, S., & Amir, M. (2018). Ultrasonication techniques used for the preparation of novel Eugenol Nanoemulsion in the treatment of wounds healings and anti-inflammatory. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.003>
- Alfaro, L., Hayes, D., Boeneke, C., Xu, Z., Bankston, D., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2015). Physical properties of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.055>
- Anton, N., Benoit, J.-P., & Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release*, 128(2), 185–199.

- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1-2), 142–147.
- Arul Raj, J., Suriya, J., Aliyas, S., Arul Soundara Rajan, Y. A. P., Murugan, K., Karuppiyah, P., Arumugam, N., Almansour, A. I., & Karthikeyan, P. (2024). Spontaneous Nanoemulsification of Cinnamon Essential Oil: Formulation, Characterization, and Antibacterial and Antibiofilm Activity against Fish Spoilage Caused by *Serratia Rubidaea* BFM08. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/bab.2555>.
- Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1-12.
- Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2019). Nanoemulsions and their potential applications in food industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3:95. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00095>
- Azrini, N., Azmi, N., Elgharbawy, A. A. M., Motlagh, S. R., & Samsudin, N. (2019). Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics. *Processes*, 7, 1–34.
- Bagale, U., Kadi, A., Abotaleb, M., & Potoroko, I., Sonawane, S. H. (2023). Prospect of bioactive curcumin nanoemulsion as effective agency to improve milk based soft cheese by using ultrasound encapsulation approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2663. <https://doi.org/10.3390/ijms24032663>
- Bakry, M., Chen, Q., & Liang, L. (2019). Developing a mint yogurt enriched with omega-3 oil: Physiochemical, microbiological, rheological, and sensorial characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(12). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14287>
- Bedoya-Serna, C. M., Dacanal, G. C., Fernandes, A. M., & Pinho, S. C. (2018). Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: In vitro study and application in Minas Padrão cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4). <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.004>
- Ben Jemaa, M., Falleh, H., Neves, M. A., Isoda, H., Nakajima, M., & Ksouri, R. (2017). Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food Chemistry*, 217, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.030>
- Bénichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.013>
- Borba, C. M., Araújo, G. M. S., Contessa, C. R., Dora, C. L., & Burkert, J. F. M. (2023). Influence of β -carotene nanoemulsions on technological parameters and stability in food matrices. *Food and Bioprocess Technology*, 16(11). <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03060-x>
- Borin, T.R., Georges, E.L., Brito-Oliveira, T.C., Moraes, I.C.F. & Pinho, S.C. (2018), Technological and sensory evaluation of pineapple ice creams incorporating curcumin-loaded nanoemulsions obtained by the emulsion inversion point method. *International Journal Dairy Technology*, 71: 491-500. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12451>
- Cassiday, L. (2016). Food emulsifier fundamentals. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 27, 10–6. <https://doi.org/10.21748/inform.11.2016.10>
- Chen, H., Hu, X., Chen, E., Wu, S., McClements, D. J., Liu, S., Li, B., & Li, Y. (2016). Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.034>
- Dasgupta, N., & Ranjan, S. (2018). Food nanoemulsions: Stability, benefits, and applications. In: *An Introduction to Food Grade Nanoemulsions*. Environmental Chemistry for a Sustainable World. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6986-4_2
- El-Sayed, H. S., & El-Sayed, S. M. (2021). A modern trend to preserve white soft cheese using nano-emulsified solutions containing cumin essential oil. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100499>
- El-Sayed, H. S., Youssef, K., & Hashim, A. F. (2022a). Stirred yogurt as a delivery matrix for freeze-dried microcapsules of synbiotic EVOO nanoemulsion and nanocomposite. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893053>
- El-Sayed, H. S., Fouad, M. T., & El-Sayed, S. M. (2022b). Enhanced microbial, functional and sensory properties of herbal soft cheese with coriander seeds extract nanoemulsion. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102495>
- Espitia, P. J. P., Fuenmayor, C. A., & Otoni, C. G. (2019). Nanoemulsions: Synthesis, characterization, and application in bio-based active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 264–285. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12405>
- Flores-López, M. L., Cerqueira, M. A., de Rodríguez, D. J., & Vicente, A. A. (2016). Perspectives on utilization of edible coatings and nano-laminate coatings for extension of postharvest storage of fruits and vegetables. *Food Engineering Reviews*, 8(292-305). <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9135-x>
- Foo, M. L., Ooi, C. W., Tan, K. W., & Chew, I. M. L. (2022). Preparation of black cumin seed oil Pickering nanoemulsion with enhanced stability and antioxidant potential using nanocrystalline cellulose from oil palm empty fruit bunch. *Chemosphere*, 287, 132108. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132108>
- Sassi, G., Shankar, S., Jaiswal, L., Salmieri, S., Karboune, S., & Lacroix, M. (2024). Nanoemulsion-based spray-dried formulation of essential oils, whey protein isolate, and maltodextrin: An approach for antifungal preservation of grated mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 154, 105919. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105919>
- Ghazy, O. A., Fouad, M. T., Saleh, H. H., Kholif, A. E., & Morsy, T. A. (2021). Ultrasound-assisted preparation of anise extract nanoemulsion and its bioactivity against different pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, 341, 128259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128259>
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>
- Gruenewald, J. (2009). Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.11.003>
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: Formation, properties, and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826-2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Gulotta, A., Saberi, A. H., Nicoli, M. C., & McClements, D. J. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated (ω -3) oils: Formation using a spontaneous emulsification method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1720-1725. <https://doi.org/10.1021/jf4054808>
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005>

- Guttoff, M., Saberi, A. H., & McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*, *171*, 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087>
- Hendy, S. A. (2023). Production of functional Karish cheese fortified with vitamin D3 in nanoemulsion. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, *48*(1). <https://doi.org/10.21608/ajar.2023.316054>
- Hidajat, M. J., Jo, W., Kim, H., & Noh, J. (2020). Effective droplet size reduction and excellent stability of limonene nanoemulsion formed by high-pressure homogenizer. *Colloids and Interfaces*, *4*(1). <https://doi.org/10.3390/colloids4010005>
- Hussein, J., El-Bana, M., Abdel Latif, Y., El-Sayed, S., Youssef, A., Elnaggar, M., & Medhat, D. (2023). Processed cheeses fortified by Laurus nobilis L. extract nanoemulsion ameliorate hyperhomocysteinemia in Ehrlich ascites carcinoma model. *Egyptian Journal of Chemistry*, *66*(2), 199-211. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.135198.5944>
- Ibrahim, R. A., Abd El-Salam, B. A., Alsulami, T., Ali, H. S., Hoppe, K., & Badr, A. N. (2023). Neoteric biofilms applied to enhance the safety characteristics of Ras cheese during ripening. *Foods*, *12*(19). <https://doi.org/10.3390/foods12193548>
- Izquierdo, P., Esquena, J., Tador, T. F., Dederen, C., Garcia, M. J., Azemar, N., & Solans, C. (2002). Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir*, *18*(1), 26-30. <https://doi.org/10.1021/la0108011>
- Jafari, S. M., & McClements, D. J. (2017). Nanotechnology approaches for increasing nutrient bioavailability. In F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 81, pp. 1-30). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.002>
- Jin, W., Xu, W., Liang, H., Li, Y., Liu, S., & Li, B. (2016). Nanoemulsions for food: Properties, production, characterization, and applications. In D. Julian McClements & L. J. Decker (Eds.), *Emulsions* (pp. 1-36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00001-5>
- Jintapattanakit, A. (2018). Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. *Pharmaceutical Sciences Asia*, *45*(1), 1-12. <https://doi.org/10.29090/psa.2018.01.017.0037>
- Jose, D., Muenmuang, C., Kitiborwornkul, N., Yasurin, P., Asavasanti, S., Tantayotai, P., & Sriariyanun, M. (2022). Effect of surfactants and co-surfactants in formulation of noni fruit extract in virgin coconut oil-based emulsion. *Journal of the Indian Chemical Society*, *99*(10), 100729. <https://doi.org/10.1016/j.jjics.2022.100729>
- Joung, H. J., Choi, M. J., Kim, J. T., Park, S., Park, H., & Shin, G. (2016). Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: Antioxidant property and in vitro digestion. *Journal of Food Science*, *81*(6), N1427-N1436. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13224>
- Kelmann, R. G., Kuminek, G., Teixeira, H. F., & Koester, L. S. (2007). Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics*, *342*(1-2), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.030>
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>
- Kheawfu, K., Pikulkaew, S., Rades, T., Müllertz, A., & Okonogi, S. (2018). Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *46*, 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.018>
- Ko, J. A., Kim, J., Doh, H., & Park, H. J. (2024). Quality evaluation and storage test for capsaicin-fortified yogurt based on the multilayer nanoemulsion system. *Food Science and Biotechnology*, *33*(2), 441-451. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01386-y>
- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(2), 331-352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>
- Koroleva, M. Y., & Yurtov, E. V. (2012). Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, *81*(1), 21-43. <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n01ABEH004239>
- Kumar, D. L., & Sarkar, P. (2018). Encapsulation of bioactive compounds using nanoemulsions. *Environmental Chemistry Letters*, *16*(1), 59-70. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0663-x>
- Laouini, A., Fessi, H., & Charcosset, C. (2012). Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion. *Journal of Membrane Science*, *423*, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.07.013>
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(6), 721-727. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.005>
- Maali, A., & Hamed Mosavian, M. T. (2013). Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *Journal of Dispersion Science and Technology*, *34*(1), 92-105. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- McClements, D. J., & Rao, J. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1413-1423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.007>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, *8*(6), 1719-1729. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- McCourt, A. F., Mulrooney, S. L., & O'Neill, G. J., et al. (2021). Postprandial 25-hydroxyvitamin D response varies according to the lipid composition of a vitamin D3 fortified dairy drink. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *72*(2), 198-210. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1984400>
- Mehrnia, M., Jafari, S. M., Makhmal-Zadeh, B. S., & Maghsoudlou, Y. (2015). Crocin loaded nano-emulsions: Factors affecting emulsion properties in spontaneous emulsification. *International Journal of Biological Macromolecules*, *84*, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.002>
- Mohammadi Jarchelo, H., Hosseini Ghaboos, S. H., & Almasi, H. (2022). Investigation of the physical properties of gluten-based active film containing free and encapsulated marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil and evaluation of its performance in the control of microbial spoilage in UF cheese and red meat. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *19*(130), 121-133. <https://doi.org/10.22034/FSCT.19.130.121>
- Mohammed, N. K., Muhiyaldin, B. J., & Meor Hussin, A. S. (2020). Characterization of nanoemulsion of *Nigella sativa* oil and its application in ice cream. *Food Science and Nutrition*, *8*(6), 2608-2618. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1500>
- Naseema, A., Kovooru, L., Behera, A. K., Kumar, K. P., & Srivastava, P. (2020). A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, *102318*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318>
- Oh, D. H., Balakrishnan, P., Oh, Y. K., Kim, D. D., Yong, C. S., & Choi, H. G. (2011). Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, *404*(1-2), 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.029>

- Panchal, B., Truong, T., Prakash, S., Bansal, N., & Bhandari, B. (2021). Influence of fat globule size, emulsifiers, and creaming on microstructure and physical properties of butter. *International Dairy Journal*, 117, 105003. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105003>
- Panghal, A., Chhikara, N., Anshid, V., Charan, M. V. S. C., Surendran, V., Malik, A., & Dhull, S. B. (2019). Nanoemulsions: A promising tool for dairy sector. In *Nanotechnology in the Life Sciences*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16522-2_8
- Polat Yemiş, G., Sezer, E., & Sıçramaz, H. (2022). Inhibitory effect of sodium alginate nanoemulsion coating containing myrtle essential oil (*Myrtus communis L.*) on *Listeria monocytogenes* in Kasar cheese. *Molecules*, 27(21), 7298. <https://doi.org/10.3390/molecules27217298>
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000-1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>
- Rai, V. K., Mishra, N., Yadav, K. S., & Yadav, N. P. (2018). Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 270, 203-225. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
- Rao, S., Radhakrishnan, P., Valiathan, S., & M, S. (2023). Rosehip oil nanoemulsion as a stable delivery system for omega-3 fatty acids to enhance the nutritional value of yogurt. *Food Chemistry Advances*, 3, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100545>
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: Effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties. *Food Research International*, 54(1), 812-820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.013>
- Saffarionpour, S. (2019). Preparation of food flavor nanoemulsions by high- and low-energy emulsification approaches. In *Food Engineering Reviews*, 11(4), 259-289. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09197-0>
- Salama, H. H., El-Sayed, H. S., Kholif, A. M. M., & Edris, A. E. (2022). Essential oils nanoemulsion for the flavoring of functional stirred yogurt: Manufacturing, physicochemical, microbiological, and sensorial investigation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.10.001>
- Salem, M. A., & Ezzat, S. M. (2019). Nanoemulsions in food industry. *Some New Aspects of Colloid Systems in Foods*, IntechOpen 2(12) 238–267. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79447>
- Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M. A., McClements, D. J., & Martín-Belloso, O. (2017). Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 439–466. DOI:10.1146/annurev-food-030216-025908
- Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 547-556. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>
- Santana, R. C., Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2013). High- and low-energy emulsifications for food applications: A focus on process parameters. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 107–122. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9065-4>
- Shamsara, O., Muhidinov, Z. K., Jafari, S. M., Bobokalonov, J., Jonmurodov, A., Taghvaei, M., & Kumpugdee-Vollrath, M. (2015). Effect of ultrasonication, pH, and heating on stability of apricot gum-lactoglobuline two layer nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 1019–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.056>
- Sheth, T., Seshadri, S., Prileszky, T., & Helgeson, M. E. (2020). Multiple nanoemulsions. *Nature Reviews Materials*, 5, 214–228. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0161-9>
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., & Shafiq, S. (2009). Celecoxib Nanoemulsion for Transdermal Drug Delivery: Characterization and in Vitro Evaluation.” *Journal of Dispersion Science and Technology* 30(6) 834–842. <https://doi.org/10.1080/01932690802644012>
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 854–867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.037>
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Solans, C., Morales, D., & Homs, M. (2016). Spontaneous emulsification. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 22, 88–93.
- Solè, I., Pey, C. M., Maestro, A., González, C., Porrás, M., Solans, C., & Gutiérrez, J. M. (2010). Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale-up. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(2), 417–423.
- Sonneville-Aubrun, O., Babayan, D., Bordeaux, D., Lindner, P., Rata, G., & Cabane, B. (2009). Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(1), 101–110.
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., & Kapoor, A. (2021). Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 1715–1735. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01126-2>
- Subasi, A., Alickovic, E., & Kevric, J. (2017). Diagnosis of chronic kidney disease by using random forest. In *CMBEIH 2017* (pp. 589–594). Singapore: Springer.
- Sugumar, S., Singh, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2015). Nanoemulsion of orange oil with non-ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: Evaluating against food spoilage yeast. *Applied Nanoscience*, 6, 113–120. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0412-z>
- Tan, C., & McClements, D. J. (2021). Application of advanced emulsion technology in the food industry: A review and critical evaluation. *Foods*, 10(4), 812. <https://doi.org/10.3390/foods10040812>
- Teo, S. H., Chee, C. Y., Fahmi, M. Z., Wibawa Sakti, S. C., & Lee, H. V. (2022). Review of Functional Aspects of Nanocellulose-Based Pickering Emulsifier for Non-Toxic Application and Its Colloid Stabilization Mechanism. *Molecules*, 27(21), 7170. <https://doi.org/10.3390/molecules27217170>
- Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1270–1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
- Unilever. (2011). Available online at: http://www.unilever.com/innovation/productinnovations/coolicecreaminnovations/?WT.LHNAV=Cool_ice_cream_innovations (accessed April 13, 2011).
- Versino, F., Lopez, O. V., Garcia, M. A., & Zaritzky, N. E. (2016). Starch-based films and food coatings: An overview. *Starch - Stärke*, 68, 1026–1037. <https://doi.org/10.1002/star.201600095>
- Walker, R. M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. *Journal of Food Engineering*, 164, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.028>

- Xue, J., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2013). Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: The enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12720-12726. <https://doi.org/10.1021/jf4043437>
- Zambrano-Zaragoza, M. L., González-Reza, R., Mendoza-Muñoz, N., Miranda-Linares, V., Bernal-Couoh, T. F., Mendoza-Elvira, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2018). Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms19030705>
- Zhang, Y., & Zhong, Q. (2017). Solid-in-oil-in-water emulsions for delivery of lactase to control in vitro hydrolysis of lactose in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03787.s001>
- Zhong, J., Yang, R., Cao, X., Liu, X., & Qin, X. (2018). Improved physicochemical properties of yogurt fortified with fish oil/ γ -oryzanol by nanoemulsion technology. *Molecules*, 23(1), 56. <https://doi.org/10.3390/molecules23010056>



Microbial Exopolysaccharides, Their Structures, Formation Mechanisms, and Effects on Human Health: Food-Related Microorganisms

Afranur Özçoban^{1,a}, Ayşe İlayda Boyacı^{2,b}, Hale İnci Öztürk^{3,c,*}

¹Department of Food Engineering, Konya Food and Agriculture University, Konya 42080, Türkiye

²Department of Molecular Biology and Genetics, Necmettin Erbakan University, Konya 42090, Türkiye

³Department of Food Engineering, Yıldız Technical University, Istanbul 34120, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Review Article

Received : 24.06.2024

Accepted : 06.09.2024

Keywords:

Adhesion

Biofilm

Homopolysaccharides

Heteropolysaccharides

Food perspective

A biofilm is a complex matrix formed by microorganisms that includes exopolysaccharides, proteins, extracellular DNA, various enzymes, and the microorganisms themselves. Biofilm cell is a more stable form of microorganism than planktonic cell. Microbial cells attach themselves to the surface after certain signals or changes, colonize to create a more favorable environment for their growth and viability, and secrete exopolysaccharide. This component is the basic matrix of biofilm. The diversity of exopolysaccharides within biofilms varies significantly depending on their specific composition, contributing uniquely to the characteristics of biofilms. This diversity in biofilms underscores the need for targeted control strategies. Biofilms can be beneficial or harmful depending on the situation and where they develop. Accordingly, microbial biofilms have dual effects on health. Biofilms can have both harmful effects on health, such as contributing to antibiotic resistance and persistent infections, while biofilms formed by beneficial microorganisms play a crucial role in enhancing food functionality. Moreover, the formation of biofilm in certain foods can contribute to the enhancement of the product matrix, particularly by improving its texture. In this review, the structures of these biofilms, their basic components, their possible safety concerns, and health benefits are discussed. Moreover, this review deals with biofilm producing bacteria in foods and assesses the prevention strategies for biofilm formation within the food industry.

^a afnanurdnmez@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0001-6971-451X>

^c ilaydaoz3398@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4407-1607>

^c inci.ozturk@yildiz.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0001-8334-0403>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Introduction

Microorganisms generally found in planktonic cells or individual cells which is more sensitive to environmental conditions than biofilm producing cells (Malheiro & Simões, 2017). They can develop by adhering to surfaces and forming structures called biofilms on the surfaces they adhere to (López et al., 2010). Anthonie van Leeuwenhoek was the first to mention the existence of biofilms, and this process dates back to the 17th century (Percival et al., 2011). Dental plaque is the most well-known and typical example of biofilm formation (Høiby, 2017). One of the well-known microorganisms that play a role in biofilm formation on implants belongs to *Staphylococcus* spp. (Hall-Stoodley et al., 2004).

The theory and subsequent studies conducted by Costerton et al. (1999) explained by which microorganisms come together and hold on to living and non-living materials. Bacteria are generally free-floating in nature. However, they can also live as a colony and form biofilm (Valen & Scheie, 2018). A biofilm that can be single or multilayered is a collection of microorganisms that are comprised of an extracellular polymeric substance. Biofilm

formation basically follows the steps of planktonic bacteria: (i) to adhere to the surface, (ii) to form colonies on the surface, and (iii) to develop there (Satpathy et al., 2016). The target of a self-generated biofilm matrix or exopolysaccharide (EPS), composed of proteins, polysaccharides, and extracellular DNA, is to guard cells from environmental factors, including competitive microorganisms, antibiotics, and the immune system of the host, which will adversely affect microbial activity (Schilcher & Horswill, 2020).

The biggest concern about biofilm is that it makes microorganisms more resistant to certain antibiotics or pH changes (Sharma et al., 2019). Accordingly, if a microorganism is pathogenic, biofilm enables cells to escape from the host immune system. Depending on the conditions, several Gram-positive and Gram-negative planktonic bacteria can secrete biofilms (Chen et al., 2013). Biofilms, which are good survival strategies for microorganisms, would also effects in food sector, such as spoiling foodstuffs, catalyzing reactions that cause metal corrosion, and causing equipment failure and economic

loss (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). This review presents the formation, structure, characteristics and functional properties of biofilms, addressing safety concerns, microorganisms involved in their production, technological aspects, and future perspectives.

Classifications of Biofilms and Their Structure

Biofilms often appear as non-uniform structures (Flemming & Wingender, 2010) and the main matrix components, EPSs, protein, and DNA are distributed between cells as shown in Figure 1. EPS, which is generally hydrophobic, is composed of polysaccharides. Microbial EPS can be divided into two categories including cell surface-associated capsular ones and EPSs secreted as free polymers. For microorganisms, the roles of EPS (Figure 1) include adhesion, cohesion, mechanical stability, adaptation, and protection against environmental stresses (Rather et al., 2021). Hernández-Jiménez et al. (2013) have concluded that human macrophages recognize and phagocytize planktonic cells more rapidly and efficiently than biofilm cells. To understand the transformation from planktonic cells to cell aggregation in biofilm, it is necessary to examine the biofilm formation process.

EPS can be extracted and purified by applying physical and chemical processes (Di Martino, 2018). Microbial growth conditions and growth stages affect the composition and characterization of EPS structure (Yoshida et al., 2015). One of the exciting facts about EPS is that some of the EPS contains rare sugars (Roca et al., 2015). These sugars in EPS are classified into categories containing fucose or rhamnose. The structure of polysaccharides determines biofilm formation (Di Martino, 2018). Polysaccharides with high molecular weights of about 10 to 1000 kDa are classified as homopolymers and heteropolymers (Nwodo et al., 2012). Homopolysaccharides contain only one type of monosaccharide while heteropolysaccharides are made up of different repeating units with varying sizes. Although homopolysaccharides are synthesized by extracellular enzymes, heteropolysaccharides are synthesized by a complex sequence of interactions involving intracellular enzymes (Abedfar & Hosseini-zhad, 2016). Considering

the EPS produced by *Cupriavidus pauculus* KPS 201, a rhamnose homopolymer containing protein, uronic acid, and nucleic acid was observed in its composition (Pal & Paul, 2013). Homopolysaccharides of lactic acid bacteria (LAB) consist of repeating units of one type of monosaccharide such as D-glucose or D-fructose (Saadat et al., 2019). On the other hand, heteropolysaccharides are also produced by the mesophilic LAB which are *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sake*, and *Lactobacillus rhamnosus* and by the thermophilic lactic acid bacteria which are *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Streptococcus thermophilus* (Saadat et al., 2019).

As mentioned before, EPS contributes to the biofilm matrix. *Pseudomonas aeruginosa* produces EPS called alginate in its biofilm (Valentine et al., 2020). Alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* cells from phagocytosis. *Escherichia coli* produces phosphoethanolamine cellulose and it provides intercellular connections (Flemming and Wingender, 2010; Moradali and Rehm, 2020). Different major polysaccharides can also be found in the biofilm structure of different microorganisms. For instance, *Staphylococcus epidermis* produces polysaccharide intercellular adhesin (PIA), which is a homoglycan composed of β -1,6-linked 2-deoxy-2-amino-d-glucopyranosyl residues (Gowrishankar & Pandian, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* produces Pel and Psl polysaccharides in their biofilms (Gowrishankar & Pandian, 2017; Cherny & Sauer, 2020). The diversity of bacterial EPSs classified to date is summarized in Table 1. Although some studies are provided in Table 1 to show the diversity of EPS, there are studies on the production and characterization of similar EPSs for a wider variety of bacterial species and even strains in the literature. Additionally, Figure 2 represents the microorganisms identified as producers of these EPSs. Heteropolysaccharides, including gellan from *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 and xanthan from *Xanthomonas campestris*, have distinct monosaccharide compositions, with gellan comprising β -D-glucose, L-rhamnose, and D-glucuronic acid units, and xanthan containing D-glucose, D-glucuronic acid, and L-rhamnose units (Wang et al., 2015; West, 2021).

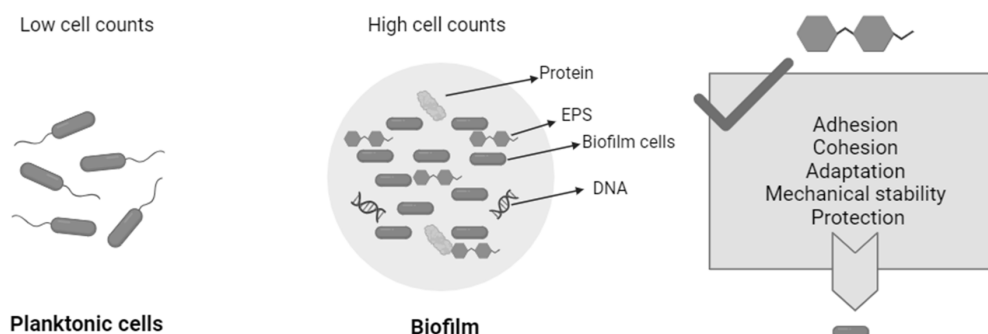


Figure 1. Biofilm structure and function of EPS component (created with BioRender version 2023).

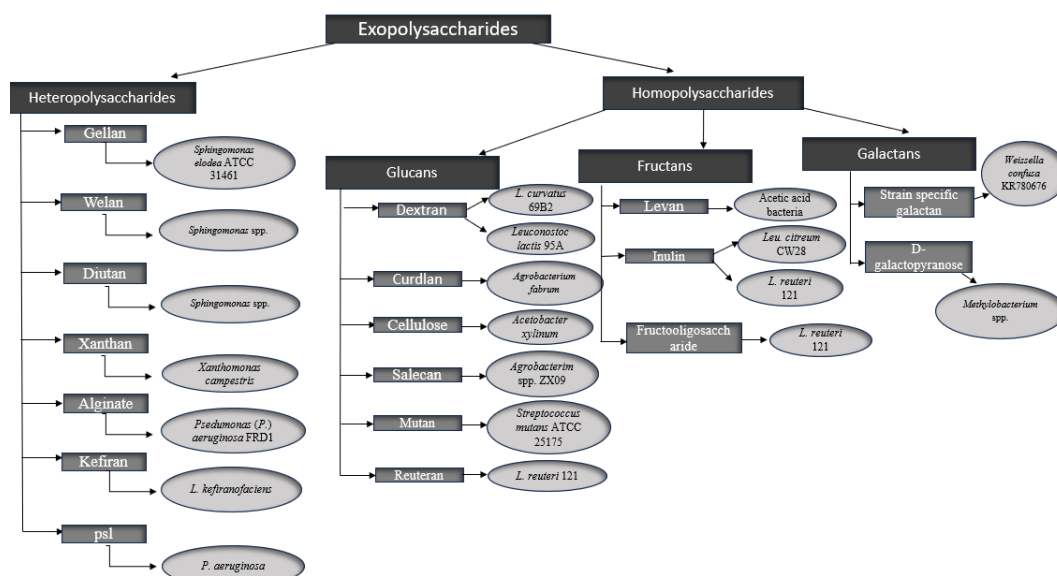


Figure 2. Bacterial sources of hetero- and homopolysaccharides.

Table 1. Exopolysaccharides defined in bacterial biofilms

Microbial exopolysaccharides			
Homopolysaccharides		Heteropolysaccharides	
Dextran	(Palomba et al., 2012)	Gellan	(West, 2021)
Curdlan	(Laxmi et al., 2018)	Welan	(Zhao et al., 2021)
Cellulose	(Ghozali et al., 2021)	Diutan	(Coleman et al., 2008)
Salecan	(Xiu et al., 2011)	Xanthan	(Nejadmansouri et al., 2021)
Mutan	(Banas et al., 2007)	Alginate	(Bustamante-Torres et al., 2022)
Reuteran	(Meng et al., 2016)	Kefiran	(Zajšek et al., 2011)
Levan	(Anguluri et al., 2022)	psl	(Cherny and Sauer, 2020)
Inulin	(Van Hijum et al., 2002; Ortiz-Soto et al., 2009)	Gellan	(West, 2021)
Fructooligosaccharide	(van Hijum et al., 2002)	Welan	(Zhao et al., 2021)
Strain specific galactan	(Kavitake et al., 2016)		
D-galactopyranose	(Verhoef et al., 2003)		

Homopolysaccharides are further categorized into glucans, fructans, and galactans. Glucans such as dextran, produced by *Leuconostoc lactis* 95A (Palomba et al., 2012), and cellulose, synthesized by *Acetobacter xylinum* (Ghozali et al., 2021), consist of glucose monomers. Fructans composed of fructose units like inulin and levan are synthesized by bacteria such as acetic acid bacteria and lactic acid bacteria, respectively (Van Hijum et al., 2002; Ortiz-Soto et al., 2009; Anguluri et al., 2022). Lastly, galactans include D-galactopyranose, synthesized by *Methylobacterium* spp., composed mainly of galactose units (Verhoef et al., 2003). This classification is crucial for understanding the biosynthesis, application, and control of these biopolymers in various industries.

Biofilm Formation by Microorganisms

Bacteria exist in nature in two forms: (i) planktonic (individual) cells and (ii) microbial aggregates (biofilm cells) (Figure 1). Biofilm formation is seen when planktonic cells come together and attach to the surface where they are located. The formation of these microcolonies is followed by the maturation of the biofilms to form large colonies (Ghanbari et al., 2016; Sauer et al., 2022).

Biofilm formation begins with the contact of planktonic cells with the surface. In the first stage, planktonic cells are free in the environment. After that, cells are aggregated, and biofilm formation occurs by increasing the cell density (Flemming & Wingender, 2010). Microorganisms attach to the surface with weak interactions like Van der Waals interactions and establish colonies there. Colonization is achieved by polysaccharides found in or secreted by microorganisms (Sauer et al., 2022). Flagella structures also facilitate the colonization. Adhesion provides long-term binding to the surface. At the same time, the aggregation of cells allows them to recognize each other and promotes the total cell density. After increasing cell density, a maturation process and a stable structure are observed. They then separate into clusters and establish colonies elsewhere (Flemming and Wingender, 2010; Yin et al., 2019; Sauer et al., 2022). Microbial biofilm formation occurs due to factors such as nutrient competition, oxygen depletion, pH, and fluctuating temperatures (Rumbaugh & Sauer, 2020). The biopolymers known as EPS are responsible for adhesion to surfaces and cohesion in the biofilm (Flemming & Wingender, 2010). EPS improves the resistance of biofilms to antimicrobial agents (Yüksel et al., 2018).

Biofilms act as a protective barrier for microorganisms. They form biofilm structures to adapt to stress conditions, to perform intercellular communication, and to establish colonization. Cell-to-cell communication, known as quorum sensing, is one of the metabolic processes leading to biofilm formation and mainly mediated by small diffusible molecules called autoinducers (Banerjee et al., 2019). Once the concentration of autoinducers reaches a threshold, cells detect these signals, initiate local colonization, and begin forming a biofilm. This process is highly conserved evolutionarily, however, different autoinducers are used for Gram-negative and Gram-positive bacteria (Fuqua et al., 1994).

Concerning Microorganisms in Foods

Foodborne disease is an issue that affects public health all around the world. About 800 foodborne outbreaks have been reported annually in the United States (Qiu et al., 2021). In 2006-2016, a great majority of these outbreaks were caused by *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes*. While pathogenic or spoilage microorganisms can pose risks to food safety, food quality, and human health, starter cultures and probiotic microorganisms can be beneficially used in food production, applications, and the development of functional foods. Fermentation, which is a process step used in the production of food products, such as yogurt, wine, and pickles, is a good example of this situation. Food microorganisms are summarized in Figure 3.

Pathogenic and Spoilage Microorganisms

Food spoilage can be defined as a deterioration or change in the sensory properties of food that are unacceptable to consumers. This process is caused by different spoilage microorganisms. Microorganisms involved in food spoilage belong to bacteria and fungi (Schmeisser et al., 2007). *Zygosaccharomyces* spp., *Saccharomyces* spp., *Debaryomyces hansenii* and *Candida* yeasts generally cause spoilage in foods, changing color, odor, and texture. Lorenzo et al. (2018) have stated that the most common spoilage bacteria in foods consist of *Lactococcus* spp., *Leuconostoc*

spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Carnobacterium* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Kurthi zapfilai*, and *Weissella* spp. Among these microorganisms, species such as *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* spp. are particularly used as starter cultures in food production. However, biofilm formation can vary depending on the species and even the strain (Wallis et al., 2018). Additionally, LAB, known as Generally Recognized as Safe (GRAS), are used in food products. Not all industrial cultures produce biofilms, but cultures that produce EPS, the main component of biofilms, can be preferred to use for enhancing the textural properties of the final product (Berthold-Pluta et al., 2019). Regarding this, detailed information is provided under the section on starter cultures.

Food pathogens are microorganisms threatening public health and food safety. The most common food pathogens encountered in many parts of the world have been identified as *Clostridium botulinum*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, and some toxin producer molds (Bintsis, 2017). Canned food produced in unfavorable conditions contains *Clostridium botulinum*. This bacterium causes botulism by producing neurotoxins that affect the human nervous system (Parkinson et al., 2017). *Escherichia coli* O157:H7, which is mostly encountered in undercooked meat, meat products and unpasteurized milk and dairy products, is also a foodborne pathogen (Bedasa et al., 2018). *Listeria monocytogenes*, which appears in foods, such as raw and processed milk and dairy products, meat and meat products, and seafoods, causes listeriosis (Shamloo et al., 2019). *Campylobacter enteritis* is the most common cause of enteric infections. *Campylobacter jejuni* infection occurs after consuming or contacting contaminated poultry, meat, milk, or water (Facciola et al., 2017; Hansson et al., 2018). *Salmonella* spp., which is one of the main pathogens occasioned by food infections, occurs in unpasteurized products, cocoa, and cake mixes. In this group, the two main *Salmonella* serotypes transmitted from animals to humans are *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium (Demirbilek, 2018; Sharma et al., 2019; Olaimat et al., 2020).

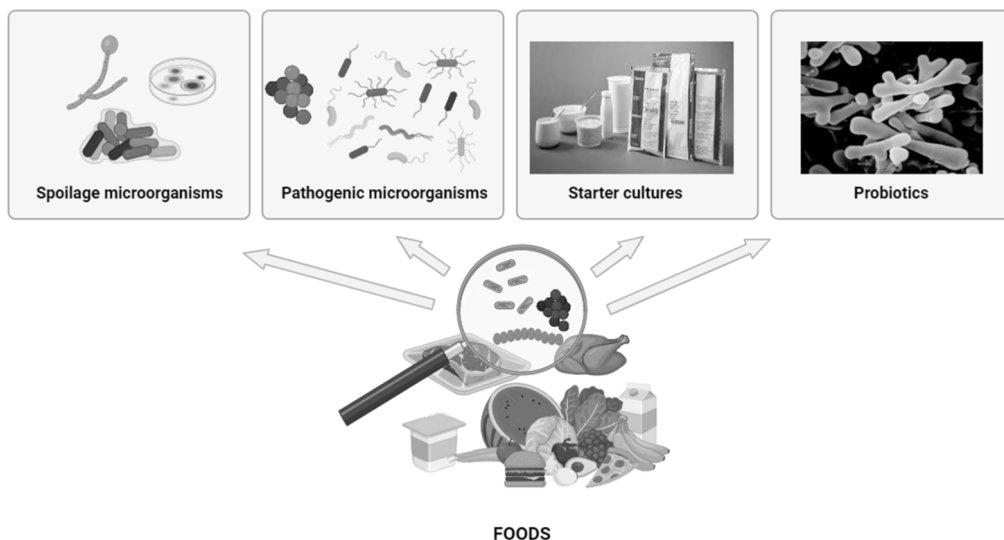


Figure 3. Microorganisms found in food products (created with BioRender version 2023).

Foodborne pathogens and their biofilms are the main causes of foodborne diseases. It has been reported that *Listeria monocytogenes* forms biofilms in food processing environments (Wang et al., 2022). *Campylobacter jejuni*, which causes gastrointestinal disorders, is frequently observed in poultry products. Pokhrel et al. (2022) have reported that this pathogen forms a biofilm when exposed to oxidative stress conditions. Essentially, biofilm formation occurs through various stress responses or quorum sensing mechanisms (Zhao et al., 2023). *Salmonella* biofilms are responsible for various foodborne diseases and contamination of the food processing environment (Seo & Kang, 2020). In this context, the use of some probiotic bacteria and lactic acid bacteria as antibiofilm agents in the food industry has been suggested (Vuotto et al., 2014).

Starter Cultures

Starter cultures can be defined as living microorganisms that contain a single type or mixture of microbial cells and are added to foods to produce final characteristic product (García-Díez & Saraiva, 2021). Starter cultures are responsible for executing the fermentation process in foods like dairy products and meat products. Besides the role of initiating fermentation, starter cultures are known to inhibit the growth of unwanted microbiota in food product (Laranjo et al., 2019). LAB, which is the most common example for starter cultures in the production of food products such as cheese and yogurt. LAB produce lactic acid from lactose, accelerating the acidification in foods. Thus, it enhances food safety through its antimicrobial effects while also improving the sensory properties of the food (Altieri et al., 2017).

Some strains of *Lactobacillus*, such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, and *Lactobacillus fructivorans*, one of the most well-known starter cultures, appear to form biofilms (Kubota et al., 2008). Biofilm formation is not always harmful. With the formation of biofilm, microorganisms, such as *Acetobacter* and *Gluconobacter* spp., which are used in vinegar production, grow more on wooden chips and this ensures efficient production (Giudici et al., 2017). In another study on starter culture for fermented milk production, biofilms of *Lactobacillus plantarum* culture had a positive effect on planktonic probiotic *Lactobacillus plantarum* cells (Hu et al., 2019). Moreover, EPS in biofilm produced by LAB has been reported to improve the texture and viscosity of foods (De Souza et al., 2023).

Probiotics

The term 'probiotic' is derived from the Greek word meaning 'for life.' Probiotics are living microorganisms that have a positive influence on the host when consumed in adequate quantities (Özkan et al., 2021). Probiotics have positive effects such as balancing the intestinal microbiota, alleviating the effects of lactose intolerance, protecting against cancer, and supporting the immune system (Binda et al., 2020). Commonly used probiotics are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, and *Streptococcus* species. The action mechanisms of probiotics are stimulation and support of the immune system and inhibition of pathogenic microorganisms by producing antimicrobial substances, blocking their attachment sites, and competing for

nutrients (Bermudez-Brito et al., 2012). The biofilm-forming probiotics as *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Lactobacillus reuteri* have demonstrated an ability to effectively delay microbial spoilage (Speranza & Corbo, 2017). Probiotics are able to secrete products, such as hydrogen peroxide, bacteriocins, organic acids, and lactic acids, to inhibit the pathogens. Interestingly, probiotics not only promote gut health but also exhibit effective biofilm inhibition. This inhibition occurs through various mechanisms, such as competing with pathogens for adhesion sites, producing antimicrobial substances, and disrupting the communication signals essential for biofilm formation (Barzegari et al., 2020).

Effects of Biofilms on Human Health and Safety Concerns

Biofilms may cause several infectious diseases. Biofilm-forming organisms can cause human infections, such as keratitis on contact lenses, chronic sinusitis, and wound infection (Del Pozo & Patel, 2007). In biofilm studies, it has been observed that bacteria within biofilms can exhibit antibiotic resistance due to several factors, including the limited penetration of antibiotics into the biofilm, the chemical composition and thickness of biofilm matrix, and the inherent resistance mechanisms of the microorganisms themselves (Singh et al., 2010; Sharma et al., 2019). The increased antibiotic resistance of biofilm cells compared to planktonic cultures, combined with endotoxin production by Gram-negative bacteria, plays a significant role in the progression of diseases (Saxena et al., 2019). These factors contribute to the persistence and severity of infections, making them more challenging to treat effectively. Another factor contributing to the resistance of biofilms against antibiotics is the accumulation of enzymes, such as β -lactamases, that degrade antibacterials within the biofilm matrix (Dincer et al., 2020).

Moreover, biofilm formed microorganisms can be evaded from immune systems by hiding themselves or staying dormant. This escape mechanism might lead to an increase in local tissue damage. Also, in the literature, there is evidence for the interaction between biofilm formation and cancer (Ivanenko, 2021). Cancer cells can be defined as cells that can uncontrolledly cell division. The aggregation of cancer cells leads to tumor formation. Cancer cells and biofilms are similar in a way that both try surviving in extreme conditions (Ivanenko, 2021). Biofilms can be involved in tumor formation, promotion, progression (Choi et al., 2023). Evidence shows that biofilm formation can lead to changes in the surrounding tissue environment that to the aid of cancer cells (Upadhyay et al., 2023).

Technological Strategies for Preventing Biofilm Formation in the Food Industry

Biofilm formation is an important problem that threatens food safety in the food industry (Lindsay & von Holy, 2006). Biofilm formation is a dynamic process, not a static one, with biofilm structures changing based on the type of microorganisms, the surface they attach to, and the environmental components (Tang et al., 2011). The first

step in controlling and preventing biofilm formation is to take necessary precautions before biofilm formation (Meyer, 2003). Effective and appropriate cleaning should be done at regular intervals in the food plant. In addition, angular and blunt equipment should not be used, as corner points generally cause accumulation, and round structures are easier to clean. Silver-plated surfaces show inhibitory properties of biofilm formation and polymer coatings show antibiofilm properties (Knetsch & Koole, 2011; Vera-González & Shukla, 2020).

Different biofilms have different spectral properties and the structure of the relevant biofilm can be studied using image processing methods (Grichkin et al., 2017; Achinas et al., 2020). In the most food factories, mechanical processes are applied to the equipment surface to remove the biofilm during cleaning (Meyer, 2003). Automatic brushing or high-pressure cleaning is more effective than gel cleaners or low-pressure cleaning. There are problems in sanitation and disinfection due to the resistant structures of biofilms, affecting both food safety and food quality (Abebe, 2020). In addition to traditional biofilm control mechanisms, ultrasonication, electric fields, enzymes, or hurdle technologies such as using hydrogen peroxide and ultraviolet light together, can be used to break down the EPS (Simões et al., 2010; Chemat et al., 2011; Vankerckhoven et al., 2011). However, the effectiveness of each technique may differ according to the applied surface, the type of bacteria that form biofilm, and the application methods (Meyer, 2003).

Since the use of chemicals for biofilm removal does not give effective results in all cases, different strategies have been developed instead of using traditional cleaning and disinfection methods. Innovative prevention strategies against biofilms are summarized in Table 2. Modern approaches such as nanotechnology-based applications,

quorum sensing inhibitors (QSIs), enzymatic biofilm disruptors, phage therapy, biologically based strategies, and photodynamic therapy (PDT) hold promise in preventing and eradicating biofilms (Zhu et al., 2022; Ribeiro et al., 2022). The mode of action of these methods may affect the early stages of biofilm formation or other phases of the biofilm development process. One of the strategies to remove biofilms involves the use of enzymes to degrade the EPS of biofilms (Johansen et al., 1997). The different structures of EPS (Table 1) require the use of different types of enzymes. For this purpose, enzymes such as DNases (human DNase I), proteases (Savinase, Everlase, Polarzyme), amylases (BAN-alpha-amylase, AMG-glucoamylase), cellulases, and glycoside hydrolases (Dispersin B, alginate lyase) are used in the disruption of biofilms (Mayton et al., 2021; Molobela et al., 2010). Another novel method is related to bacteriophage application to prevent the formation of biofilms by microorganisms (Squires, 2018). Bacteriophages are viruses that specifically infect bacteria, allowing for targeted action against biofilm-forming pathogens without harming beneficial microorganisms, unlike broad-spectrum antibiotics (Tian et al., 2021). Moreover, bacteriophages produce enzymes such as depolymerases, which degrade the EPS within biofilms, weakening the biofilm structure and enhancing susceptibility to antimicrobial agents (Topka-Bielecka et al., 2021). However, there are some difficulties with the use of phage theory. One of these challenges is that bacteriophages reach target bacteria and bind to specific receptors found on bacterial cells. In planktonic cells, this connection is much easier than biofilm cells. The microbial cells in the biofilm are enclosed by a matrix, which prevents bacteriophages from easily binding to their receptors (Pires et al., 2017).

Table 2. Novel and traditional elimination methods for biofilm

Novel Methods	Description	Advantages	Limitations	References
Enzymatic Degradation	Targeting destruction of EPS	Prolong resistance development	Heterogeneity structure of EPS, accordingly single enzyme might not effective	(Ramakrishnan et al., 2022; Wang et al., 2023)
Quorum Sensing Inhibitors	Blockage on cell-to-cell communication	Usage of natural product as an inhibitor	Targeting and specificity problems	(Machado et al., 2020)
Photodynamic Therapy	Usage of light, molecular oxygen, and photosensitizer against microorganisms	Eliminate microorganisms by not using harsh chemicals	Low penetration of PS with biofilm Short-life time of ROS	(Hu et al., 2022)
Nanotechnology based methods	Development of new surfaces as an antibacterial surface	Prevention of adhesion ability of microorganisms	Potential of leaching	(Li et al., 2021; Birkenhauer, & Neethirajan 2015)
Bacteriophage	Usage of “virus” to eliminate biofilm formation.	Alternative approaches to antibiotic usage	Limited host-range	(Topka-Bielecka et al., 2021)
Traditional Methods	Description	Advantages	Limitations	References
Cleaning in place	Cleaning of equipment via circulating fluid flow	Less time consuming	Not easy to remove accumulated biofilms	(Loeffler, 2006)
Ultrasound cleaning	Usage of mechanical energy	No usage of chemical	Low intensity does not affect bacterial biofilm	(Elafify et al., 2024)
Antibiotics	Disruption of microorganisms’ cellular integrity	Easy to use Adaptable for combined therapy	Development of antibiotic resistance	(Sullivan et al., 2020)

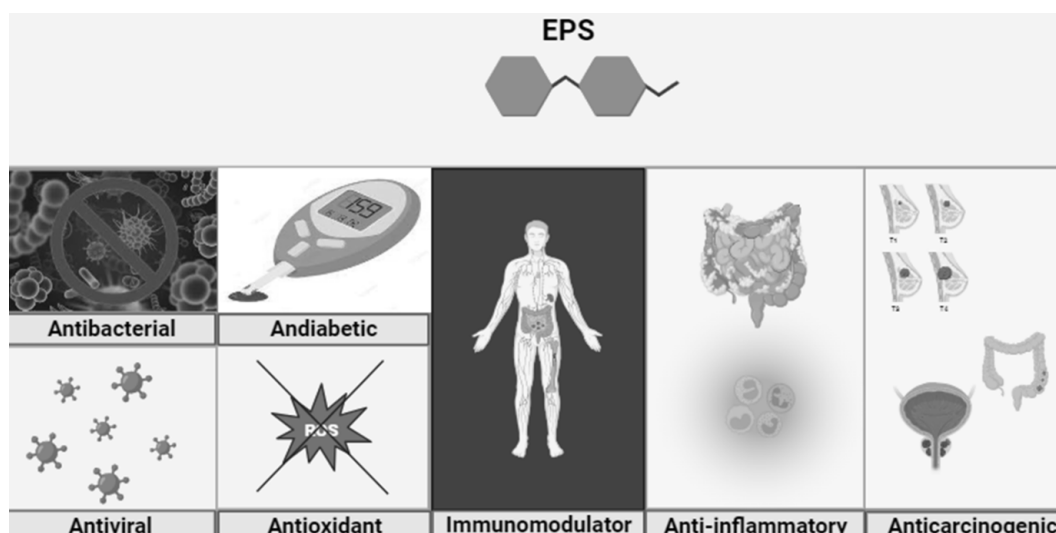


Figure 4. Functional properties of EPSs secreted by microorganisms (created with BioRender version 2023).

PDT is an emerging strategy with diverse applications, particularly noted for its potent antimicrobial effects (Songca & Adjei, 2022). PDT relies on chemical reactions triggered by the interaction of molecular oxygen, a photosensitizer, and light (Niculescu & Grumezescu, 2021). When these three components come together, they produce toxic compounds known as reactive oxygen species (ROS) or singlet oxygen. These compounds degrade the matrix of biofilms, breaking down polysaccharides and protein. This weakening of the matrix leads to the disruption of the biofilm. Silver nanoparticles are widely recognized for their strong antimicrobial properties (Liao et al., 2019). They can penetrate biofilm matrices and disrupt bacterial cells by generating ROS, damaging cell membranes, and interfering with bacterial DNA. Other metallic nanoparticles, such as gold, zinc oxide, and titanium dioxide, are also effective in inhibiting biofilm formation and promoting the degradation of existing biofilm (Pourmehdiabadi et al., 2024). Another approach involves using QSIs to effectively disrupt biofilm formation and inhibit the production of virulence factors (Wang et al., 2024). Quorum sensing relies on a variety of molecules in its process, and QSIs can interfere with this system, thereby reducing the formation of biofilms and the pathogenicity of bacteria. To enhance the efficacy of QSIs, they can be used in combination with antibiotics. QSIs work through three primary mechanisms: directly inhibiting the production of the signal molecule, promoting the breakdown of the signal molecule, or inhibiting the interaction between the signal molecule and its receptor (Carradori et al., 2020). Developing new technologies and methodologies will give people the power to control unwanted microbial cell growth.

Functional Properties of Secreted Biofilms

EPS, which differs in terms of physical and chemical properties, is secreted by microorganisms out of the cell (Karygianni et al., 2020). Although it is a matter of great concern that pathogenic microorganisms produce EPS, these biopolymers produced by beneficial bacteria can have positive effects on human health. It has been observed that EPSs have beneficial effects, such as antioxidant, immunomodulator, anticarcinogenic, anti-inflammatory,

and antiviral, in several studies (Angelin & Kavitha, 2020; Wu et al., 2021; Zayed et al., 2022). Ayyash et al. (2020) have reported that EPSs produced by *Lactobacillus plantarum* isolates among LAB have antioxidant, antidiabetic, and antitumor activities. Jeong et al. (2017) revealed that the EPS synthesized by *Lactobacillus kefiranoferiens* DN1 showed both bacteriostatic and bactericidal activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. The functional properties of EPS are summarized in Figure 4. Secreted EPSs can be used in many industries, such as food, pharmacology, textiles, and cosmetics. The physicochemical and functional properties of some EPS species make them basic microbial synthesis products with various biotechnological applications (Osemwegie et al., 2020; Zayed et al., 2022).

Tarannum et al. (2023) conducted a study on the antioxidant activity of EPS produced by new bacterial strains isolated from bovine milk. Among the 63 isolates, 4 strains exhibited higher EPS production and significant antioxidant activity, along with high antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Another study demonstrated that *Lactobacillus plantarum* 12 exhibited effects against *Shigella flexneri*, revealing that the EPS produced by *Lactobacillus plantarum* 12 not only inhibited the biofilm formation but also reduced the antibiotic resistance of *Shigella flexneri* (Song et al., 2020).

Due to the significant diversity of the gut microbiota, maintaining a balance among the various microorganisms is of paramount importance. To prevent and address imbalances within the gut microbiota, several strategies have been developed. Among these strategies, the use of probiotics, prebiotics, and postbiotics has emerged as a promising solution. During the journey of probiotics in the body, they are faced with different conditions and their effectiveness might be decreased until they reach their target (Han et al., 2021). To overcome these challenges, embedding probiotics in biofilms may present an effective solution. Biofilms are known for their resistance to environmental changes, including variations in pH, temperature, nutrient derivation, and exposure to antibiotics, thereby offering enhanced protection and viability for the probiotics (Gao et al., 2022).

Concluding Remarks and Future Perspectives

This review has provided a comprehensive overview of microbial biofilms, their structures, formation mechanisms, and their implications for human health, particularly in the context of food-related microorganisms. Biofilms are specialized structures that enable microorganisms to survive and proliferate in challenging environmental conditions. Although the general mechanism for biofilm formation is the same for most microorganisms, species- or even strain-specific behaviors are unique to each microorganism. The formation of biofilms by pathogenic and spoilage microorganisms presents serious challenges for food safety and public health, as these biofilms are often at the center of persistent infections and can accelerate the degradation of food products, leading to both safety risks and economic losses in the food industry. Conversely, biofilms produced by beneficial microorganisms, particularly those rich in EPS, offer valuable technological and functional benefits. These EPS can enhance food quality by improving texture, stability, and extending shelf life. However, the dual nature of biofilms, as both beneficial and harmful, underscores the need for ongoing research. Future studies should aim to better understand the specific roles of EPS in promoting health and food quality, as well as to develop innovative and sustainable strategies to prevent the formation of harmful biofilms. Advancing our knowledge in these areas is crucial for maximizing the benefits of microbial biofilms while minimizing their risks.

Declarations

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

References

- Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Abedfar, A., & Hosseini-zhad, M. (2016). Overview of the most important characterization of exopolysaccharides produced by probiotics bacteria and their biological function. ResearchGate. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10, 47-55. <https://doi.org/10.9790/2402-1011034755>
- Achinas, S., Yska, S. K., Charalampogiannis, N., Krooneman, J., & Euverink, G. J. W. (2020). A technological understanding of biofilm detection techniques: A Review. *Materials*, 13(14), 3147. <https://doi.org/10.3390/ma13143147>
- Altieri, C., Ciuffreda, E., Maggio, B., & Sinigaglia, M. (2017). Lactic acid bacteria as starter cultures. In B. Sperenza, A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *Starter cultures in food production*, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1002/9781118933794.ch1>
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 173-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Anguluri, K., La China, S., Brugnoli, M., De Vero, L., Pulvirenti, A., Cassanelli, S., & Gullo, M. (2022). Candidate acetic acid bacteria strains for levan production. *Polymers*, 14(10), 2000. <https://doi.org/10.3390/polym14102000>
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., Esposito, G., Hunashal, Y., Obaid, R. S., & Hamed, F. (2020). Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 938-946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.171>
- Banas, J. A., Fountain, T. L., Mazurkiewicz, J. E., Sun, K., & Vickerman, M. M. (2007). *Streptococcus mutans* glucan-binding protein- A affects *Streptococcus gordonii* biofilm architecture. *FEMS Microbiology Letters*, 267(1), 80-88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00557.x>
- Banerjee, D., Shivapriya, P. M., Gautam, P. K., Misra, K., Sahoo, A. K., & Samanta, S. K. (2019). A review on basic biology of bacterial biofilm infections and their treatments by nanotechnology-based approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, 90(2), 243-259. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-01065-7>
- Barzegari, A., Kheyrolahzadeh, K., Khatibi, S. M. H., Sharifi, S., Memar, M. Y., & Vahed, S. Z. (2020). The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infection and Drug Resistance*, 13, 659-672. <https://doi.org/10.2147/idr.s232982>
- Bedasa, S., Shiferaw, D., Abraha, A., & Moges, T. (2018). Occurrence and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* O157:H7 from food of animal origin in Bishoftu town, Central Ethiopia. *International Journal of Food Contamination*, 5(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40550-018-0064-3>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61(2), 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Berthold-Pluta, A. M., Pluta, A. S., Garbowska, M., & Stasiak-Różańska, L. (2019). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria-health-promoting properties and application in the dairy industry. *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology*, 58(2), 191-204. <https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.2.191>
- Birkenhauer, E., & Neethirajan, S. (2015). Prevention and control of biofilms in the food industry and bio-nanotechnology approaches. *Biofilms in the Food Environment*, 84-130. <https://doi.org/10.1002/9781118864036.ch4>
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B. D., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529-563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Bustamante-Torres, M., Arcentales-Vera, B., Estrella-Núñez, J., Yáñez-Vega, H., & Bucio, E. (2022). Antimicrobial activity of composites-based on biopolymers. *Macromol*, 2(3), 258-283. <https://doi.org/10.3390/macromol2030018>
- Carradori, S., Di Giacomo, N., Lobefalo, M., Luisi, G., Campestre, C., & Sisto, F. (2020). Biofilm and quorum sensing inhibitors: The road so far. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(12), 917-930. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1830059>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013). Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18488-18501. <https://doi.org/10.3390/ijms140918488>

- Cherny, K. E., & Sauer, K. (2020). Untethering and degradation of the polysaccharide matrix are essential steps in the dispersion response of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 202(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00575-19>.
- Choi, E., Murray, B., & Choi, S. (2023). Biofilm and cancer: interactions and future directions for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12836. <https://doi.org/10.3390/ijms241612836>
- Colagiorgi, A., Festa, R., Di Ciccio, P.A., Gogliettino, M., Balestrieri, M., Palmieri, G., & Anastasio, A., Ianieri, A. (2020). Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: A new potential tool to fight bacterial biofilms. *Food Control*, 107, 106815. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106815>
- Coleman, R.J., Patel, Y.N., & Harding, N.E. (2008). Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas* sp. ATCC 53159. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology/Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(4), 263–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0303-3>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Das, K., Rajawat, M. V. S., Saxena, A. K., & Prasanna, R. (2017). Development of *Mesorhizobium ciceri*-based biofilms and analyses of their antifungal and plant growth promoting activity in chickpea challenged by fusarium wilt. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 48–59. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0610-8>
- De Souza, E. L., De Oliveira, K. R., & De Oliveira, M. E. (2023). Influence of lactic acid bacteria metabolites on physical and chemical food properties. *Current Opinion in Food Science*, 49, 100981. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100981>.
- Del Pozo, J. L., & Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology and Therapeutics/Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(2), 204–209. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100247>
- Demirbilek, S. K. (2018). Salmonellosis in animals. In *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72192>
- Di Martino, P., (2018). Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiology*, 4(2), 274–288. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.274>
- Dincer, S., Uslu, F. M., & Delik, A. (2020). Antibiotic resistance in biofilm. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92388>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 327–349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Elafify, M., Liao, X., Feng, J., Ahn, J., & Ding, T. (2024). Biofilm formation in food industries: Challenges and control strategies for food safety. *Food Research International*, 190, 114650. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114650>
- Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., & Laganà, P. (2017). *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *PubMed*, 58(2), E79–E92. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28900347>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Gao, J., Sadiq, F. A., Zheng, Y., Zhao, J., He, G., & Sang, Y. (2022). Biofilm-based delivery approaches and specific enrichment strategies of probiotics in the human gut. *Gut Microbes*, 14(1), 2126274.
- García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2544. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>
- Ghanbari, A., Dehghany, J., Schwebs, T., Müsken, M., Häussler, S., & Meyer-Hermann, M. (2016). Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep32097>
- Ghozali, M., Meliana, Y., & Chalid, M. (2021). Synthesis and characterization of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using liquid tapioca waste. *Materials Today: Proceedings*, 44, 2131–2134. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.274>
- Giudici, P., De Vero, L., & Gullo, M. (2017). Chapter 10: Vinegars. In İ. Y. Şengün (Ed.) Acetic acid bacteria: fundamentals and food applications, pp. 261-287. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Gowrishankar, S., & Pandian, S. K. (2017). Modulation of *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) extracellular polymeric layer by marine cyclic dipeptide-cyclo(1-leucyl-1-prolyl) thwarts biofilm formation. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1859(7), 1254–1262. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.009>
- Grishkin, V., Iakushkin, O., & Stepenko, N. (2017). Biofouling detection based on image processing technique, *Computer Science and Information Technologies (CSIT)*, 158-161, <https://doi.org/10.1109/csitech.2017.8312162>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., Liu, J., Lu, L., Ling, Z., Berglund, B., Yao, M., & Li, L. (2021). Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 609722. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>
- Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R., & Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 30–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.12870>
- Hernández-Jiménez, E., Del Campo, R., Toledano, V., Vallejo-Cremades, M. T., Muñoz, A., Largo, C., Arnalich, F., Garcia-Rio, F., Cubillos-Zapata, C., & López-Collazo, E. (2013). Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.012>.
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 125(4), 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>.
- Hu, M. X., Li, J. N., Guo, Q., Zhu, Y. Q., & Niu, H. M. (2019). Probiotics biofilm-integrated electrospun nanofiber membranes: a new starter culture for fermented milk production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(11), 3198–3208. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05024>
- Hu, X., Zhang, H., Wang, Y., Shiu, B. C., Lin, J. H., Zhang, S., Lou, C. W., & Li, T. T. (2022). Synergistic antibacterial strategy based on photodynamic therapy: Progress and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 450, 138129. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138129>
- Ivanenko, N. (2021). Biofilm and tumor: interpretation of interaction and treatment strategies. Review. *Medical Science of Ukraine (MSU)*, 17(1), 104-120. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2021.13>

- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., Kim, H. S., & Seo, K. H. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033>.
- Johansen, C., Falholt, P., & Gram, L. (1997). Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3724–3728. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3724-3728.1997>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Kavitake, D., Devi, P. B., Singh, S. P., & Shetty, P. H. (2016). Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.099>
- Knetsch, M. L. W., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340–366. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., & Hasnain, S. E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>
- Laranjo, M., Potes, M. E., & Elias, M. (2019). Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 853. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00853>
- Laxmi, V.M., Latha, D., & Jayasree, A. (2018). Production and characterization of curdlan from *Agrobacterium* sp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(11), 4871–4874. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(11\).4871-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(11).4871-74)
- Li, X., Chen, D., & Xie, S. (2021). Current progress and prospects of organic nanoparticles against bacterial biofilm. *Advances in Colloid and Interface Science*, 294, 102475. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102475>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Lindsay, D., & Von Holy, A. (2006). What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*, 108(1), 27–37. <https://doi.org/10.1108/00070700610637616>
- Loeffler, D. (2006). Modern brewery sanitation. In *Brewing*, pp. 308-334. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845691738.308>
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P., Domínguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J., & Franco Ruiz, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. In F. J. Barba, A. S. Sant'Ana, V. Orlien, M., Kouuba (Eds.), *Innovative technologies for food preservation*, pp. 53-107. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>
- Machado, I., Silva, L. R., Giaouris, E. D., Melo, L. F., & Simões, M. (2020). Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Food Research International*, 127, 108754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108754>
- Malheiro, J., & Simões, M. (2017). Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices. In *Elsevier eBooks*, pp. 97–113. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100382-4.00004-6>
- Mayton, H. M., Walker, S. L., & Berger, B. W. (2021). Disrupting irreversible bacterial adhesion and biofilm formation with an engineered enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(13), e00265-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00265-21>
- Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Yin, H., Gerwig, G. J., & Dijkhuizen, L. (2016). Structural determinants of alternating ($\alpha 1 \rightarrow 4$) and ($\alpha 1 \rightarrow 6$) linkage specificity in reuteransucrase of *Lactobacillus reuteri*. *Scientific Reports*, 6(1), 35261. <https://doi.org/10.1038/srep35261>
- Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 249–253. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(03)00047-7)
- Molobela, I.P., Cloete, T.E., & Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 1515-1524.
- Moradali, M. F., & Rehm, B. H. A. (2020). Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, 18(4), 195-210. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0313-3>
- Nejadmansouri, M., Razmjooei, M., Safdarianghomsheh, R., Shad, E., Delvigne, F., & Khalesi, M. (2021). Semi-continuous production of xanthan in biofilm reactor using *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biotechnology*, 328, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.004>
- Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2021). Photodynamic therapy—an up-to-date review. *Applied Sciences*, 11(8), 3626. <https://doi.org/10.3390/app11083626>
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Holy, M. A., Al-Nabulsi, A. A., Obaid, R. S., Alaboudi, A. R., Ayyash, M., & Holley, R. (2020). Microbial safety of oily, low water activity food products: A review. *Food Microbiology*, 92, 103571. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103571>
- Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V., & López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(4), 275–281. <https://doi.org/10.1080/10242420400014251>
- Osemwegie, O. O., Adetunji, C. O., Ayeni, E. A., Adejobi, O. I., Arise, R. O., Nwonuma, C. O., & Oghenekaro, A. O. (2020). Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. *Heliyon*, 6(6), e04205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205>
- Özkan, E. R., Demirci, T., Öztürk, H. N., & Akin, N. (2020). Screening *Lactobacillus* strains from artisanal Turkish goat skin casing Tulum cheeses produced by nomads via molecular and *in vitro* probiotic characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2799–2808. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1090>
- Pal, A., & Paul, A. K. (2013). Optimization of cultural conditions for production of extracellular polymeric substances (EPS) by serpentine rhizobacterium *Cupriavidus pauculus* KPS 201. *Journal of Polymers*, 2013(1), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/692374>
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventorino, V., & Pepe, O. (2012). polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2737–2747. <https://doi.org/10.1128/aem.07302-11>

- Parkinson, N., Johnson, E., & Ito, K. (2017). Botulism. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, H.P. Riemann (Eds.), *Foodborne diseases*, pp. 381-393. *Elsevier*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00019-X>
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. (2011). Introduction to biofilms. In Springer series on biofilms, pp. 41–68. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5_2.
- Pires, D., Melo, L., Boas, D. V., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Current Opinion in Microbiology*, 39, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.004>
- Pokhrel, S., Boonmee, N., Tulyaprawat, O., Pharkjaksu, S., Thaipisutikul, I., Chairatana, P., Ngamskulrungraj, P., & Mitrpant, C. (2022). Assessment of biofilm formation by *Candida albicans* strains isolated from hemocultures and their role in pathogenesis in the zebrafish model. *Journal of Fungi*, 8(10), 1014. <https://doi.org/10.3390/jof8101014>
- Pourmehdiabadi, A., Nobakht, M. S., Hajjam Balajorshari, B., Yazdi, M. R., & Amini, K. (2024). Investigating the effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on the formation of biofilm and persister cells in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Basic Microbiology*, 64(5), 2300454. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300454>
- Qiu, W., Wang, Q., Li, M., Li, N., Wang, X., Yu, J., Li, F., & Wu, D. (2021). Peptidoglycan-inspired peptide-modified injectable hydrogels with enhanced elimination capability of bacterial biofilm for chronic wound healing. *Composites. Part B, Engineering*, 227, 109402. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109402>
- Ramakrishnan, R., Singh, A. K., Singh, S., Chakravorty, D., & Das, D. (2022). Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102352. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102352>
- Rather, M. A., Gupta, K., Bardhan, P., Borah, M., Sarkar, A., Eldiehy, K. S. H., Bhuyan, S., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. *Journal of Basic Microbiology*, 61(5), 380–395. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000678>
- Ribeiro, M., Gomes, I. B., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2022). Photodynamic therapy and combinatory treatments for the control of biofilm-associated infections. *Letters in Applied Microbiology*, 75(3), 548-564. <https://doi.org/10.1111/lam.13762>
- Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. a. M. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in Microbiology*, 6, 288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00288>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., & Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>.
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmölle, M., Stewart, P.S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2018). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0757-6>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/membr.00026-19>
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>
- Seo, H. J., & Kang, S. S. (2020). Inhibitory effect of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* on the biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium. *Food Control*, 117, 107361. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107361>
- Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi Moghadam, Z., Halberg Larsen, M., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 241-254. <https://doi.org/10.1128/membr.00026-19>
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573-583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1955–1958. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Song, Y., Sun, M., Feng, L., Liang, X., Song, X., Mu, G., Tuo, Y., Jiang, S., & Qian, F. (2020). Antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* 12 exopolysaccharides against *Shigella flexneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15), e00694-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00694-20>
- Songca, S. P., & Adjei, Y. (2022). Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3209. <https://doi.org/10.3390/ijms23063209>
- Speranza, B., & Corbo, M. R. (2017). The impact of biofilms on food spoilage. In *Elsevier eBooks*, pp. 259–282. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00014-5>.
- Sullivan, G. J., Delgado, N. N., Maharjan, R., & Cain, A. K. (2020). How antibiotics work together: molecular mechanisms behind combination therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 57, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.012>
- Squires, R. (2018). Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. *New Zealand Veterinary Journal*, 66(5), 229–235. <https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1491348>
- Tang, L., Pillai, S., Revsbech, N. P., Schramm, A., Bischoff, C., & Meyer, R. L. (2010). Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling*, 27(1), 111–121. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.544848>
- Tarannum, N., Hossain, T. J., Ali, F., Das, T., Dhar, K., & Nafiz, I. H. (2023). Antioxidant, antimicrobial and emulsification properties of exopolysaccharides from lactic acid bacteria of bovine milk: Insights from biochemical and genomic analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 186, 115263. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115263>
- Tian, F., Li, J., Nazir, A., & Tong, Y. (2021). Bacteriophage—a promising alternative measure for bacterial biofilm control. *Infection and Drug Resistance*, 14, 205-217. <https://doi.org/10.2147/IDR.S290093>

- Topka-Bielecka, G., Dydecka, A., Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-derived depolymerases against bacterial biofilm. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), *10*(2), 175. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175>
- Toushik, S. H., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., & Ha, S. D. (2020). Fighting with old foes: The pledge of microbe-derived biological agents to defeat mono- and mixed-bacterial biofilms concerning food industries. *Trends in Food Science & Technology*, *99*, 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.019>
- Upadhyay, A., Pal, D., & Kumar, A. (2023). Substantial relation between the bacterial biofilm and oncogenesis progression in host. *Microbial Pathogenesis*, *175*, 105966. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105966>
- Valen, H., Scheie A. (2018). Biofilms and their properties. *European Journal of Oral Sciences*, *126*, 13-18. <https://doi.org/10.1111/eos.12425>
- Valentine, M. E., Kirby, B. D., Withers, T. R., Johnson, S. L., Long, T. E., Hao, Y., Lam, J. S., Niles, R. M., & Yu, H. D. (2019). Generation of a highly attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for commercial production of alginate. *Microbial Biotechnology*, *13*(1), 162–175. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13411>
- Van Hijum, S. a. F. T., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van Der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(9), 4390–4398. <https://doi.org/10.1128/aem.68.9.4390-4398.2002>
- Vankerckhoven, E., Verbessem, B., Crauwels, S., Declerck, P., Muylaert, K., Willems, K. A., & Rediers, H. (2011). Exploring the potential synergistic effects of chemical disinfectants and UV on the inactivation of free-living bacteria and treatment of biofilms in a pilot-scale system. *Water Science & Technology*, *64*(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.718>
- Vera-González, N., & Shukla, A. (2020). Advances in biomaterials for the prevention and disruption of *Candida* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 538602. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.538602>
- Verhoef, R., de Waard, P., Schols, H.A., Siika-aho, M., & Voragen, A.G., (2003). *Methylobacterium* sp. isolated from a Finnish paper machine produces highly pyruvated galactan exopolysaccharide. *Carbohydrate Research*, *338*(18), 1851–1859. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00261-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00261-1)
- Vuotto, C., Longo, F., & Donelli, G., (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science*, *6*(4), 189-194. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.52>
- Wallis, J. K., Krömker, V., & Paduch, J. H. (2018). Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. *AIMS microbiology*, *4*(2), 209–224. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.209>
- Wang, S., Zhao, Y., Breslawec, A. P., Liang, T., Deng, Z., Kuperman, L. L., & Yu, Q. (2023). Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *9*(1), 63. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>
- Wang, J., Lu, X., Wang, C., Yue, Y., Wei, B., Zhang, H., Wang, H., & Chen, J. (2024). Research progress on the combination of quorum-sensing inhibitors and antibiotics against bacterial resistance. *Molecules*, *29*(7), 1674. <https://doi.org/10.3390/molecules29071674>
- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., & Zhou, G. (2016). Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.049>
- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X., & Dong, Q. (2022). Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International*, *156*, 111143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111143>
- West, T.P. (2021). Synthesis of the microbial polysaccharide gellan from dairy and plant-based processing coproducts. *Polysaccharides*, *2*(2), 234–244. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2020016>
- Wu, J., Zhang, Y., Ye, L., & Wang, C. (2021). The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides *in vitro*: A review. *Carbohydrate Polymers*, *253*, 117308. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117308>
- Xiu, A., Zhou, M., Zhu, B., Wang, S., & Zhang, J. (2011). Rheological properties of Salecan as a new source of thickening agent. *Food Hydrocolloids*, *25*(7), 1719–1725. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.013>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019b). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), 3423. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Yoshida, K., Tashiro, Y., May, T., & Okabe, S. (2015). Impacts of hydrophilic colanic acid on bacterial attachment to microfiltration membranes and subsequent membrane biofouling. *Water Research*, *76*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.045>
- Yüksel, F. N., Buzrul, S., Akçelik, M., & Akçelik, N. (2018). Inhibition and eradication of *Salmonella Typhimurium* biofilm using P22 bacteriophage, EDTA and nisin. *Biofouling*, *34*(9), 1046–1054. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1538412>
- Zajšek, K., Kolar, M., & Goršek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, *64*(4), 544–548. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00704.x>
- Zayed, A., Mansour, M. K., Sedeek, M. S., Habib, M. H., Ulber, R., & Farag, M. A. (2022). Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: Novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, *42*(4), 597–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1942779>
- Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1-23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>
- Zhao, M., Zhang, H., Xu, X., Li, S., & Xu, H. (2021). A strategy for the synthesis of low-molecular-weight welan gum by eliminating capsule form of *Sphingomonas* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, *178*, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.157>
- Zhu, T., Yang, C., Bao, X., Chen, F., & Guo, X. (2022). Strategies for controlling biofilm formation in food industry. *Grain & Oil Science and Technology*, *5*(4), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.06.003>



Applications and Development Potential of Nano-Biotechnology in Biomedical and Health Areas

Leila Mehdizadehtapeh^{1,a,*}

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Güneysu, Rize, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 12.09.2024 Accepted : 04.11.2024</p> <p><i>Keywords:</i> Nano-biotechnology Nanostructure Biomedical Health R & D</p>	<p>Nanotechnology is the research field of atomic, molecular or macromolecules with a size in the range of 1-100 nm to develop structures, devices and systems with new functional properties. Nanotechnology is a discipline that offers novel opportunities in physics, chemistry, biology, engineering and health, and is prioritized by modern governments and private organizations in the establishment of priority research infrastructures. This discipline provides numerous opportunities in the development of food, optics, electronics, pharmaceuticals, medical imaging techniques, especially in the biomedical and health fields. Nanobiotechnology is the combination of nanotechnology and biotechnology disciplines. Nanobiotechnology is utilized biomedically and medically in the treatment of cancer and neurodegenerative diseases, smart drug delivery, vaccine and biosensor development, medical imaging, gene therapy. Nano-based approaches are being developed to improve traditional biotechnological methods and limit the side effects caused by conventional treatments. Therefore, of the applicability of nanotechnology in different disciplines and fields, nano-based techniques play important roles for a sustainable future and have an impact on global economies. In this study, it is aimed to review the application opportunities and development potentials of nano-biotechnological approaches, especially in biomedical and health fields. In relation to the subject, nanotechnology and application areas, nanobiotechnology and its development, global nanobiotechnology market, classification of nanobiotechnologies, nanobiotechnological tools and application areas are emphasized.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(s2): 2441-2450, 2024

Nano - Biyoteknolojinin Biyomedikal ve Sağlık Alanlarında Uygulamaları ve Gelişim Potansiyeli

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 12.09.2024 Kabul : 04.11.2024</p> <p><i>Anahtar Kelimeler:</i> Nano-biyoteknoloji Nanoyapı Biyomedikal Sağlık Ar-ge</p>	<p>Nanoteknoloji, yeni fonksiyonel özelliklere sahip yapılar, cihazlar ve sistemler geliştirmek üzere 1-100 nm aralığında büyüklüğü olan atomik, moleküler veya makromoleküllerin araştırma alanıdır. Nanoteknoloji, fizik, kimya, biyoloji, mühendislik ve sağlık dallarında novel fırsatları sunan, çağdaş devletler ve özel kuruluşlarca öncelikli araştırma alt yapılarının kurulumunda öncelik verilen bir disiplindir. Bu bilimdalı başta biyomedikal ve sağlık alanları olmak üzere, gıda, optik, elektronik, farmasötik, tıbbi görüntüleme teknikleri geliştirmekte sayısız fırsatlar sunmaktadır. Nanobiyoteknoloji ise, nanoteknoloji ve biyoteknoloji disiplinlerinin birleşimidir. Nanobiyoteknolojiden biyomedikal ve tıbbi olarak kanser ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde akıllı ilaç tesliminde, aşı ve biyosensör geliştirmede, tıbbi görüntülemede, gen tedavisinde faydalanılmaktadır. Nano tabanlı yaklaşımlar, geleneksel biyoteknolojik yöntemleri iyileştirmek ve geleneksel tedavilerin neden olduğu yan etkileri sınırlandırmak için geliştirilmektedir. Bu sebeple, nanoteknolojinin farklı disiplinler ve alanlarda uygulanabilir olması sayesinde, nano tabanlı teknikler sürdürülebilir bir gelecek için önemli roller oynamakta ve Global ekonomiler üzerinde etkiler yaratmaktadır. Bu çalışmada, nano-biyoteknolojik yaklaşımların özellikle biyomedikal ve sağlık alanlarında uygulama fırsatları ve gelişim potansiyellerinin derlenmesi amaçlanmıştır. Konuyla ilgili olarak, nanoteknoloji ve uygulama alanları, nanobiyoteknoloji ve gelişimi, Global nanobiyoteknoloji pazarı, nanobiyoteknolojilerin sınıflandırılması ile nanobiyoteknolojik araçlar ve uygulama alanları üzerinde durulmuştur.</p>

leila.mehdizadehtapeh@erdogan.edu.tr | <https://orcid.org/0000-0001-8759-5016>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Nanoteknoloji terimi, ilk defa Richard Feynman'ın 1959 yılında aşağıdan yukarıya (top to bottom) nesnelere inşa etme vizyonu olan "There's plenty of room at the bottom" yaklaşımından doğmuştur. Nanobiyoteknoloji terimi ise, nanoteknolojik gelişmelerin biyolojik sistemler ve yaşam bilimlerinde ele alınması sonucunda ortaya çıkmıştır (Dutt ve ark., 2023). Bir diğer ifadeyle, nanobiyoteknoloji, milyarlarca yıllık evrim sürecinden geçen canlı hücrelerdeki nano yapılar olan DNA, RNA, proteinler, adipoz dokular ve polisakaritlerin etkileşim mekanizmalarından yola çıkarak nano düzeydeki yapılarını ve etkileşimlerini taklit edebilmeyi amaçlamaktadır (Bayda ve ark., 2019; Lugani ve ark., 2021). Bu sebeple, nanobiyoteknoloji, bu gibi doğal yapı taşlarının (nano seviyedeki biyolojik aktivite ve özgülüklerini gözlemleyerek yüksek katma değerli tasarımlara dönüştürmek için fırsatlar sunmaktadır. Örneğin, terapötik potansiyeli olan mRNA moleküllerinin stabilizasyonu ve daha iyi iletiminde (Xian ve ark., 2023), kronik yara tedavisinde multişlevsel akıllı sistemlerin tasarımında (Jiang ve ark., 2022), glioma gibi en sızdırgan ve ölümcül kanser türlerinde immün yanıtın düzenlenmesinde (Qiu ve ark., 2023), novel terapötiklerin hassas ve öngörülü şekilde sunulmasında (Dutt ve ark., 2023), iskemik inme gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde (Tang ve ark., 2023), kardiyovasküler rahatsızlıklarda (Han ve ark., 2024) ile hastalıkların tanısı, tedavi süreci ve izlenmesinde kullanılan görüntüleme sistemlerinin desteklenmesi (Wang ve ark., 2022) gibi çok sayıda örnekler verilebilir.

Bilim adamlarına göre nanoteknolojinin belirli bir hedef hücre veya organa ilaç sağlamak için biyoaktif nano yapılarla ilerleme kaydedeceği tahmin edilmektedir. Bu gibi karmaşık sistemlerin nanorobotikler ve nanomalzemelerde yapay organların büyümesini kontrol edebilecek olan moleküler nanosistemler ile süreceği belirtilmektedir (Shahcheraghi ve ark., 2022). Örneğin, günümüz dünyasında insan vücudundaki sorunları iyileştirmek için gerekli tedavilerin çoğu konvansiyonel cerrahi yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, nanobiyoteknolojik uygulamaların, örneğin nanorobotların kullanımı gibi, tüm bu sorunların ameliyatsız şekilde tedavisine yardımcı olacaktır (Patel ve Patel, 2023).

Günümüzde bu alanda Ar-Ge merkezleri kurularak, gıda, optik, elektronik, farmasötik, görüntüleme teknikleri, biyomalzemeler, biyosensörler ve *in vitro* tanı kitleri geliştirmek için nanobiyoteknolojiden faydalanılmaktadır. Ülkemizde üniversiteler bünyesinde nanobilim ve nanoteknolojik 19 adet Ar-Ge merkezi faaliyetlerine devam etmektedir (De Moraes ve ark., 2014; Paksoy ve Gür, 2021).

Bu çalışmada, nano-biyoteknolojik yaklaşımların özellikle biyomedikal ve sağlık alanlarında uygulama fırsatları ve gelişim potansiyellerinin derlenmesi amaçlanmıştır. Konuyla ilgili olarak, nanoteknoloji ve uygulama alanları, nanobiyoteknoloji ve gelişimi, Global nanobiyoteknoloji pazarı, nanobiyoteknolojilerin sınıflandırılması ile nanobiyoteknolojik araçlar ve uygulama alanları üzerinde durulmuştur.

Nanoteknoloji ve Uygulama Alanları

Nanoteknoloji, atom ve moleküler ölçekte nano boyutta tasarlanan yapılardır. Nanoteknoloji, kapsamlı bilimsel ve teknolojik araştırmalar, malzeme ve imalat,

nanoelektronik, tıp, sağlık, çevre ve enerji, biyoteknoloji, bilgi teknolojisi ve ulusal güvenlik gibi alanlarda yeni atılımlarının yolunu açmış olup, çağımızın "endüstriyel devrimi" olarak adlandırılmaktadır (Alshora ve ark., 2016).

Nanoteknoloji, günlük yaşamın hemen her alanına giriş yapmıştır. Nanoteknoloji, aynı zamanda Avrupa Birliği (AB)'nin sürdürülebilirlik, yüksek rekabet gücü ve büyümeye katkıda bulunacağına inandığı öncelikli teknolojik alanlardan birisidir (Ali ve ark., 2014). Doğa, bilim için her zaman ilham kaynağı olmuştur. Yeryüzünde mevcut biyolojik sistemlerin çoğu nano ölçekte dir. Nanoteknoloji alanında en çok öne çıkan çalışma alanları arasında, nanotıp, nanobiyoteknoloji, nanobiyofarmasötik ve nanobiyomekanik bulunmaktadır. Bu alanlarda yürütülen çalışmalar tıp, yeni ilaç geliştirme ve mevcut terapötiklerin modifikasyonu konularında başarı oranı yüksek stratejilerin gelişimine destek sağlamaktadır (Alshora ve ark., 2016).

Nanobiyoteknolojinin Gelişimi

Nano-biyoteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknolojinin bir tür ara yüzü olup, nanoteknolojinin yaşam bilimlerinde uygulanma fırsatlarını araştırmaktadır. Biyoteknoloji, yeni ürün ve hizmetler geliştirmek amacıyla, hücresel, moleküler ve genetik süreçlerin yönlendirilmesinde kullanılmaktadır (Ram ve ark., 2014). Nanobiyoteknoloji alanında çalışılan başlıca konular şunlardır: (1) erken tanı ve tedavi için nano görüntüleme teknikleri, (2) intrasellüler analiz için nicel araçlar, (3) hastalık moleküler mekanizmalarını belirlemek ve etkili terapötik hedef tanımlama için biyolojik sistem modelleme, (4) konvansiyonel *ex-vivo/in vitro* laboratuvar tekniklerin performanslarını yükseltme ve (5) ilaç taşıma sistemleri.

Nanobiyoteknoloji endüstrisi, nano ölçekte modifiye edilen materyallerin daha etkili olacağı fikriyle biyoteknoloji, kimya, fizik ve sistem mühendisliği gibi disiplinleri bir araya getirmektedir (Rai ve Ingle, 2012).

Nanomalzeme ve nanoparçacıklar, farklı kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri sebebiyle, tarım, gıda, tıp, eczacılık, elektronik, malzeme bilimi, çevre ve enerji sektörlerinde kullanılan konvansiyonel teknolojilerin yerini almaktadır (Parisi ve ark., 2015). Bunun temel nedeni ise, nanoteknoloji ve biyoteknoloji disiplinlerinin birlikte araştırmacılara başarı olasılığı daha yüksek alternatif çözümler sunmasıdır (Maine ve ark., 2014). Bu sayede, konvansiyonel ürünlerin özellikleri önemli ölçüde iyileştirilebilmekte, farklı işlevsellikler kazandırılmakta ve üretim maliyetleri azaltılabilmektedir (Takeda ve ark., 2009; Sharp ve Lander, 2009; Maine ve ark., 2014).

Nano-biyoteknoloji alanında yapılan buluşların sayısı artmakla birlikte, yeni ürünlerin ticarileştirilmesi veya firmaların sektöre girişi ile ilgili strateji ve eylem planları hakkında henüz doyurucu bilgi paylaşılmamaktadır.

Örneğin, hangi firmaların biyoteknoloji ve nanoteknoloji alt yapı olanaklarına sahip oldukları, bunları ne zaman, nerede ve nasıl geliştirdikleri, hedefledikleri ve yatırım rakamları hakkında yeterli verilere ulaşılamamaktadır (Wang ve Shapira, 2009; Alvarado ve ark., 2019).

Global Nanobiyoteknoloji Pazarı

Yeni pazarlar geliştirmek ve stratejik olarak bu alanda ilkler arasında yer alabilmek önemli avantajlar sağlamaktadır. Nanobiyoteknolojinin kullanım ve yararlanma alanları geniş ve kapsamlıdır. Biyomedikal alanda, yeni ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine yönelik uygulamaları dikkat çekmektedir. Teknolojik ürünün türüne bağlı olarak, küresel nanobiyoteknoloji pazarı, nanoparçacıklar, nanokristaller, kuantum noktaları, lipozomlar, polimer yapılı dendrimerler, nano gözenekli malzemeler ve supramoleküler nanoyapılar kategorilerinde tanımlanmaktadır. Global nanoteknoloji sektörü'nün 2023 yılı itibarıyla pazar büyüklüğü 21,8 milyar dolardır. Bu rakamın 2024 yılı sonunda 26,2 milyar dolara ve 2032 yılında ise 93,9 milyar dolara ulaşacağı. Nano-biyoteknoloji pazarı: ilaç salımı, biyolojik görüntüleme, mikrobisidal ve araştırma araçları olmak üzere alt kategorilere ayrılmaktadır (Market Research Future, 2024).

Coğrafi olarak, nanobiyoteknoloji pazarı: Kuzey Amerika, Avrupa, Asya Pasifik, Latin Amerika, Orta Doğu ve Afrika bölgelerine ayrılmıştır. Adı geçen tüm bölgelerde Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, İngiltere, Almanya, Çin, Japonya, Brezilya ve Körfez Arap İşbirliği Konseyi ülkeleri yer almaktadır. Nano-biyoteknoloji pazarının bu bölgesel kümelenmelerdeki büyüme hızının 2029 yılı sonuna kadar daha ivmelenerek artacağı tahmin edilmektedir (Kaur ve Thombre, 2021).

Nanobiyoteknolojilerin Sınıflandırılması

Nanobiyoteknoloji, nanomalzemelerin biyoteknolojide uygulamalarını kapsayan mültidisipliner bir alandır. Özellikle, tıp, sağlık, görüntüleme, immünoproteomik, ilaç salımı, doku mühendisliği, kozmetik, tarım, gıda güvenliği ve eczacılık gibi sahalarda önemli uygulamaları bulunmaktadır. Nanobiyoteknoloji, hedefli ilaç taşıma ve gen tedavisi araçları, nanobiyosensörler, nanodiagnostikler, nanobiyoyapılar, nanoakışkan ve biyo-uyumlu nanocihazlar gibi ileri teknolojilerin geliştirilmesinde önemli roller oynamaktadır. Ayrıca, biyolojik, kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak çevre dostu, düşük maliyetli nanopartikül, nanomalzeme ve nanokolloid sentezinde değerlendirilmektedir (Jain, 2019).

Nanobiyoteknolojik yenilikler ekseriyetle nano ölçekte çeşitli şekil ve boyutlarda olan yapılar ile ilgilenmektedir. Bu noktadan hareketle, genel olarak ilaç dağıtımı, biyofarmasötikler, tedarikçiler ve enstrümantasyon ile teşhis başlıklı dört ana sınıfta kümelendikleri görülmektedir (Freitas, 2005; Maine ve ark., 2014).

Nanobiyoteknolojik Araçlar ve Uygulama Alanları

Nano-biyoteknoloji, ilaçların bozunmasını ve temizlenmesini yavaşlatarak terapötik ajanların vücutta daha uzun süre kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca, yeni terapötiklerin geliştirilmesi, hastalıkların tanı ve tedavi süreçleri, travmatik yaraları iyileştirme ve ağrı kontrolü gibi değişik konulara da katkıda bulunmaktadır. Nanopartiküllerin vücut içerisindeki dolaşım ve kalım süresi yüzey yükü modifiye edilerek kontrol edilebilmektedir. Pozitif yüklü nano yapıların hücre içine geçişi artarken, negatif yüklü unsurların kan dolaşımında

sirkülasyon süresi uzamaktadır. Nano yapılar, ilaçların biyoyararlanımını ve hidrofobik preparatların suda çözünürlüğünü arttırmakta, . ilacın farmakokinetiğini değiştirerek hedef bölgeye tam olarak yönlendirilmesini sağlamakta ve de aynı anda birden fazla ilacın nanoyapıya yüklenebilmesini mümkün kılmaktadır (Sahoo ve Labhasetwar, 2003; Jurj ve ark., 2017).

Farmakokinetik İlaç Taşıma Sistemleri

Nano-biyoteknoloji yalnızca gen tedavisi ve hedefe yönelik ilaç taşıma aracı olarak değil (Na ve Bae, 2002), biyomedikal uygulamalarda (biyobelirteçler, moleküler görüntüleme ve biyosensörler) (Crommelin ve ark., 2003), ve patolojilerin erken tanısında Per ve ark., 2007; Khan ve ark., 2015) önemli katkılar sunmaktadır. Özellikle, polimer nanopartikül ilaç taşıma sistemleri stabilite, yüksek biyoyararlanım, doğru hedefe ulaşma ve hücre içinde tanı süreçlerinde kontrollü salınım gibi avantajlar sunmaktadır (Brigger ve ark., 2002). Bu avantajların temelinde ise, nanoparçacıkların uygun boyut ve gözeneklilik, hızlı çözünme ve etkili inhalasyonu bulunmaktadır (Freitas, 2005). İmplant edilebilen polimerik ilaç taşıma/salınım sistemleri, etken ajanın önceden belirlenmiş hızda kontrollü salımı için nano sporlardan yararlanmaktadır (Xia ve ark., 2008; Kim ve ark., 2010).

Nanoparçacıklar, metalik, organik veya her ikisi birlikte hibrid yapılar olmak üzere üç temel grupta ele alınmaktadır. Biyoyararlanımı geliştirmek için nanoyapıların dış yüzeyleri doğal, benzeşik (pseudo) veya biyolojik tanımayı sağlayan biyosensörler ile donatılabilmektedir. Formülasyon sırasında dikkate alınacak özellikler, yüzey alanının hacmine, şekline ve boyutuna olan oranlarıdır (Yamada ve Harashima, 2014; Jain, 2019).

Lipozomlar

Lipozomlar, fosfolipitler ve benzer amfipatik lipitler tarafından oluşturulan stabil mikroskobik veziküllerdir. Lipozomların özellikleri, lipit bileşimine, boyutuna, yüzey yüküne ve hazırlama yöntemine göre değişmektedir. Lipozomların lipit çift katmanları, yapı olarak hücre zarında bulunan türdeşleri ile benzerlikler göstermektedir. Lipofilik maddeler, bu katmanlardan ilaçların hücre zarları ile taşınmasını mümkün kılmaktadır. Günümüzde, lipozomal nanopartiküllerden oluşan ilaç taşıma sistemleri kanser tedavisinde kullanılan geleneksel lipozomlar ve kemoterapötik ajanlara göre biyoyoumluluk, anti-tümör ilaçların kontrollü ve sürekli salımı ve daha düşük toksite gibi avantajlar sunmaktadır (Alavi ve Hamidi, 2019; Zielińska ve ark., 2020).

Polimerik Nanopartiküller

Nanopolimer yapıların başlıca görevi; hedeflemeyi ve kontrollü salımı sağlamaktadır. Hedef bölgesine enjeksiyon sonrası etkin madde salımını günler ve/veya haftalar sürecek şekilde mümkün kılmaktadır. İlaç taşıma sistemlerindeki doğal ve/veya sentetik polimer partiküllere ek olarak; nükleik asitler, proteinler ve peptid unsurlar da kullanılabilmektedir (Zielińska ve ark., 2020; ; Gagliardi ve ark., 2021). Son yıllarda, albümin gibi, doğal ve poliakrilamid, poliakrilat ve polikaprolakton sentetik polimerlerden oluşan nanopartiküller tıp, biyoteknoloji, nanoteknoloji ve diğer yaşam alanlarında yoğun şekilde araştırılmaktadır. Bu bağlamda, doğal polimerlerin,

özellikle selüloz, kitosan ve aljinik asitin, diğer biyopolimerlere veya sentetik polimerlere göre daha yüksek biyoyoumlulukları, biyobozunurlukları ve erişilebilirlikleri gibi üstün nitelikleri tıbbi kullanımlarını da arttırmaktadır (Saeed ve ark., 2020; Gagliardi ve ark., 2021).

Kitosan Nanopartiküller

Kitosan yengeç, istakoz, karides ve böcekler gibi canlıların kabuklarında bulunan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilmektedir. Selüloz, kitosan ve aljinat polimerleri de dâhil olmak üzere, yara tedavisinde güvenli ve düşük maliyetli malzemeler olarak dikkat çekmektedir. Ayrıca, bu partiküllerin, intranazal enjeksiyonunu takiben, tetanoz toksoidine lokal ve sistemik immün yanıtların yanı sıra insülinin nazal absorpsiyonun düzeltilmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Kitosan-siRNA nanopartiküllerin formülasyonu, intranazal uygulama yoluyla doğrudan beyne ulaşmaktadır (Malhotra ve ark., 2014; Nishiyama ve ark., 2016; Alavi ve Nokhodchi, 2020).

Polimerik Miseller

Polimerik miseller, hidrofobik ve hidrofilik gruplara sahip olmaları, kolay erişilebilmeleri ve radyoaktif işaretleme avantajları olan yaklaşık 10 nm boyutunda tek tabakalı yapılardır. Blok kopolimerlerin kendi kendine bir araya gelmesiyle oluşan çekirdek-kabuk tipi nanopartiküllerdir. Boyut, stabilite, salınım hızı ve ilaçları birleştirme verimliliği gibi kritik avantajları nedeniyle gen ve ilaç taşıma mekanizmaları olarak tercih edilmekte ve kanser araştırmalarında umut vermektedirler (Shrestha ve Bhattacharya, 2020).

Nanosüngerler

Gözenekli ve karbon içerikli nanosüngerler 1-2 nm boyutlarında olan alternatif taşıyıcı sistemlerdir. Gözenekli yapılarının sağladığı avantajları sayesinde taşıyacakları etkin maddeyi (ajan) içlerinde hapsederek hidrofilik ve hidrofobik ilaçları taşıyabilmektedirler. Ayrıca, ilaçların kontrollü salınımı sağlamak ve degradasyonu önleyerek yapısal stabiliteyi korumaktadırlar. İlaçların çözünürlüğünü arttıran nanosüngerler, oral, topikal ve parenteral dozaj formlarında formüle edilebilmektedirler (Pugliese ve Gelain, 2017; Pandey ve ark., 2018).

Peptit Mikroenkapsülasyon

Peptidik biyomateriyaller rejeneratif tıpta ilgi uyandırmaktadırlar. Peptidik yapı iskeleleri, biyomimetik yaklaşımlarda hedefe yönelik tedavi stratejilerine özel tasarlanmaktadır. Biyoaktif peptitler, hücre-hücre tanıma (epitoplar), metabolizma (enzimler) ve hücresel yapı (aktin) olarak tüm canlı sistemlerde mevcuttur. Nanoteknoloji yaklaşımlarında kullanılan peptitler, biyoyoumluluk toleranslarının yüksek olmasına rağmen, immünojenik değildirler (Gharsallaoui ve ark., 2007). Kimya, kozmetik, farmasötik ve besin endüstrisinde geniş şekilde kullanılmaktadırlar. Mikroenkapsülasyon, homojen veya heterojen bir matrisle gömülü maddenin etrafında koruyucu bir bariyer oluşturarak, istenmeyen bileşenlerin maskelenmesini, dış ortamdan korunmasını ve bileşiklerin kontrollü salınımını sağlamaktadır. Bunu ise küçük parçacıkların veya damlacıkların bir çeşit kaplama materyali ile çevrenmesi sayesinde gerçekleştirmektedirler (Chan, 2019; Advanced Material Industry, 2021).

İmmünizasyon ve Aşı

Nanotıp, hastalıkların erken evrelerinde tanı koyabilmek için yeni yöntemlerin tasarlanması ile uğraşan alandır. Son yıllarda, klinik araştırmacıların nanoteknoloji tabanlı araçlara ve nanomalzemelere yönelik talepleri hızla artmaktadır (Giret ve ark., 2015). Bu tür malzemelerin pazar büyüklüğü 2023 yılı sonunda 219 milyar dolar olarak gerçekleşmiştir. Bu rakamın 2032 yılı sonunda ise 563 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir (Towards Healthcare, 2024).

Tıp alanında nano yapılar, çeşitli kimyasalları (ilaçlar, kemoterapötik ajanlar veya görüntüleme substratları) ve biyolojik materyalleri (antijenler, antikolar, RNA veya DNA), endositoz ve/veya ısı ve ışık desteği eşliğinde, canlı sistemlere iletmek için kullanılabilirler (de Moraes ve ark., 2014; El-Sayed ve Kamel, 2020). Nano malzemelerin yeni endüstriyel araçlar ile entegrasyonu, ilaca dirençli patojenler karşı aşı geliştirme ve farklı kanser türlerinde geleneksel yaklaşımlar ile aşılamayan sorunların çözümünde umut verici sonuçlar vermektedir (Duncan ve Gaspar, 2011).

Terapötik nanoparçacıkların, sentetik ilaçlara göre, sağladıkları başlıca avantajları şunlardır: (Swain ve ark., 2015): (1) ilaç atılım süresini uzatarak renal atılımı ve/veya hepatik yıkımı azaltma, (2) sağlıklı dokularda düşük birikim, (3) ilacın hasta dokular toplanma yeteneğini artırma ve (4) ilaç salınımı/taşımayı engelleyen kimyasal, anatomik, fizyolojik ve klinik bariyerlerin kolaylıkla geçebilme.

Nanoboyutluluk, nanoyapılara reaktivite, çözünürlük ve verimlilik artışı kazandırmaktadır. Örneğin, geleneksel tıpta eser miktarda uygulanan soya fasulyesi yağı nano damlacıklara dönüştürülürse, canlıların membranını ile birleşerek çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmaları inaktifleştirebilmektedir (Mainini ve ark., 2021; Hernández ve ark., 2021).

Nanotaşıyıcılar, immünojenik patojenlerin özelliklerinin takliti ve anti-tümör immün yanıtlarını yeniden oluşturmak amacıyla tümörle ilişkili antijenler (TAA) sağlamaktadırlar. Ayrıca, tümör infiltre edici lenfositlerin aktivitesinin kontrolü için immünomodülatör ilaçların verilmesi ve anti-tümör bağışıklığın desteklenmesini mümkün kılmaktadırlar. Nanotaşıyıcılar, tümör hücrelerini spesifik olarak öldürmek için, tümör mikro çevresi'ne (TME) kemoterapötikleri yüklemek amaçlı kullanılmaktadırlar. Bu sayede, TAA salınımları anti-tümör bağışıklığına katkıda bulunmaktadırlar (Hajipour ve ark., 2012; Huang ve ark., 2019).

Nanotaşıyıcılar, bileşimlerine göre, lipid veya polimer bazlı iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Nanotaşıyıcılar, tek bir formülasyona, sinerjistik etkiye sahip birden fazla ilacın dahil edilebilmesi gibi avantajlara sahiptirler. Bu sayede, anti-tümör immün tepkisini arttırmak mümkün olmakta, immünomodülasyon ve immün stimülasyonun bir veya daha fazla yönünden yararlanılmaktadır (Schudel ve ark., 2019; Hernández ve ark., 2021).

Nanotaşıyıcılar, hedef hücreye antijen ve adjuvanı eş zamanlı ulaştırma ve lenf düğümlerine direkt biçimde ulaşma sayesinde lenfatik sisteme ekstrasözasyon olmakta ve antikanser aşılarda geliştirilmesinde önemli roller oynamaktadırlar. Antijenlerin, bir protein veya peptidin kovalent bağlanmasını sağlayarak nano yapının bileşenlerine dahil edilmesi mümkün görünmektedir.

Nükleik asitler elektrostatik etkileşimler yoluyla nano taşıyıcının yüzeyine (siRNA'lara benzer şekilde) eklenebilmekte ve antijen sunan hücreler (APC) tarafından antijenik peptidler olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca, DNA ve mRNA bazlı kanser aşılı, çoklu antijenli olarak tasarlandığında, immünojenisiteyi güçlendirmektedir. Bu nanosistemler, çoklu antijenik epitoplara ve patojen türevli immün adjuvanları tek bir nanoyapıya dâhil ederek canlı enfeksiyonları daha yakından taklit etme mümkün olabilmektedir (Duncan ve Gaspar, 2011; Youssef ve ark., 2019).

Gen Tedavisi ve Aktarımı

Kalıtımsal kusurlar eksik ve/veya yanlış protein sentezi ile sonuçlanabilmektedir. Gen tedavisi, bu gibi kalıtımsal hatalara bağlı hastalıkların tedavisini amaçlayan biyoteknolojik ve terapötik bir stratejidir. Ayrıca, hatalı genlere tekrar işlevsellik kazandırmak ve/veya sağlıklı genler ile değişimlerini hedeflemektedir. Gen aktarımı ve gen tedavisi hücrede değişik yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Memeli hücreleri tipik olarak birkaç mikronluk çapa sahip olup, organelleri ise nm boyutlarındadır. Bu durum, nanocihazların konvansiyonel muadillerine göre hücrelere daha kolay erişebilmelerini sağlamaktadır (Anis, 2019; Mirón-Barroso ve ark., 2021).

Nanomalzemeler, genetik materyalin hücre/doku/organa aktarımı için geliştirilmektedirler. Verimli gen aktarımı aracı kadar küçük bir cihaz geliştirmek için çeşitli gerekliler bulunmaktadır. Klinik araştırmalar, viral vektörlerin gen aktarımında verimliliklerinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Bu gibi engellerin üstesinden gelebilmek için, plazmit DNA, mRNA ve siRNA gibi nanoboyutlu taşıyıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Toksite ve düşük transfeksiyon verimliliği gibi engeller gen aktarımı sistemlerinin karşısında çözüm bekleyen önemli başlıklardan bazılarıdır (Chen ve ark., 2016; Jampilek ve Placha, 2021).

Nanopartiküller, gen aktarımı uygulamalarında gelecek vaat etmektedirler. Başlıca avantajları şunlardır (Fathi-Achachelouei ve ark., 2019): (1) nükleik asitleri ve nükleazları çevresel etkenlere karşı koruma, (2) nükleik asidi hedefine yönlendirme ve yan etkileri azaltma, (3) nükleik asitlerin hücre içine girişini kolaylaştırma ve (4) gen iletimi stabilitesini uzun süreli koruma.

Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp

Doku ve organ naklinde en önemli problem donör sayısının düşük olmasıdır. Ayrıca, immünoşüpresyon gereksinimi ve nakil reddi gibi diğer dezavantajları bulunmaktadır. Bu sebeple, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp adıyla yeni bir multidisipliner alan ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, implant edilebilir doğal doku/organa benzer yapıları yapay ortamda geliştirmek için biyoloji, malzeme ve mühendislik bilim dallarından faydalanan bir alandır (Danie Kingsley ve ark., 2013).

In vivo koşullarda hedef dokunun hücresele aktivitelerini izleyebilmek ve biyoaktif bileşikleri uygulayabilmek için nano ölçekli yaklaşım gerekmektedir. Nanopartiküllerin olumlu etkileri ise, hücresele yapıların üzerinde yüksek seviyede kontrolü sağlamalarıdır (Sudhakar ve ark., 2015; Hasan ve ark., 2018). Altın nanoparçacıkların yüzey konjügasyonu ve iletken özellikleri, gümüş ve diğer

metalik nanoparçacıkların ve metal oksitlerin antimikrobiyal niteliği, kuantum noktalarının floresan sunuşu ve karbon nanotüplerin elektromekanik özellikleri doku mühendisliğinin başarılı uygulamalarına örnek gösterilebilir. Ayrıca, manyetik nanoparçacıklardan (karbon nanotüpler, dendrimerler ve lipozomlar), hücre mekanotransdüksiyonu, gen aktarımı, hücre modelleme ve üç boyutlu (3D) doku geliştirmek için de faydalanılmaktadır. Tıbbi nanorobotlar, hücrelerin izlenmesinde, mikro ortam algılamada ve transfeksiyon ajanlarının verilmesinde tercih edilmektedirler (Akhshabi ve ark., 2018).

Gıda Güvenliği

Güvenilir olmayan su ve gıda tüketimi bulaşıcı salgınlara/hastalıklara başlıca nedenleri arasında gelmektedir. Su ve gıdalarda patojen veya toksinlerin düzeyinin saptanmasında kullanılan konvansiyonel (mikrobiyolojik) yöntemler zaman alıcı olup, modern moleküler tabanlı (PCR, Q-PCR) yöntemler ise maliyetçe yüksektirler. Ayrıca, seçicilik ve hassasiyetleri bazen dezavantaj dahi olabilmektedir (Bokhari, 2018). Nanoteknoloji, biyoanalitlerin nanopartikül tabanlı testler ile tespitini mümkün kılmaktadır. Koloidal metal nanopartiküller (altın, gümüş, titanyum ve platin) bu sebeple ilgi çekmektedirler. Yüzey plazma rezonans esaslı (SPR) metal nanoparçacıkların renkleri, parçacık boyutu ve morfolojileri ile doğrudan ilişkilidir. Metal nanoparçacıklardan yükselen ışık saçılım sinyallerine dayanan biyokimyasal tahlil, DNA, proteinler ve ilaçlar arasındaki afinite etkileşiminin belirlenmesinde kullanılmakta ve "kullanıcı dostu" optik algılama cihazlarının geliştirilmesini desteklemektedir (Viktor ve ark., 2016).

Biyofarmasötikler

Aktif farmasötik bileşenlerden nano taşıyıcı sistemlerde faydalandığında, verimlilik ve performansları yükselmektedir. Nanofarmasötikler, "nanoteranostik" olarak da bilinen yeni bir kavramı bilim dünyasına kazandırmıştır. Nanofarmasötikler, kişiselleştirilmiş tıp (personalized medicine) alanında çağdaş fırsatlar sunmakta ve kişi (hasta) odaklı ilaç formülasyonlarının önünü açmaktadırlar (Kozma ve ark., 2020). Polietilen glikollerin (PEG) proteinlere veya ilaç salım/taşıma nano sistemlerine konjügasyonu, karmaşık nano-biyofarmasötiklerin tedavi etkinliğini artıran bir stratejidir. Genellikle immünojenik tasarlanan bu yeni nesil ilaçlar, ilaca karşı aşırı duyarlılık indikatörleri olan anti-PEG IgG ve IgM gibi antikörlerin artış düzeylerini dikkate almaktadır. (Siontorou, 2013).

Nanokor Türevi Nano-Biyoteknolojik Kitleler

Nanokor, rekombinant protein ve antikör parçasıdır. Tipik antikörler, uzun zincirli monomerik yapılar oldukları için selektif özellikli antijenlere bağlanırlar. Ökaryotik ve prokaryotik organizmaların vücut sıvılarında bulunur veya sentezlenirler. Nanoboyutun sulu çözeltide stabilize ve çözünürlük, yeniden katlama, immün yanıtı tetiklememe, özellikli antijene karşı hassas etkinlik, kolay izleme, görüntülenme, hedefe yönelik yüksek afinite vb üstün özellikleri yangı, tümör ve nörodejeneratif hastalıkların tanısı için yeni test kitlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (Muyldermans, 2013; Helma ve ark., 2015). Radyonüklid

veya flüoresan boya etiketli, flüoresan protein veya kromojenik enzim füzyonlu ve bivalent (çift değerli) bir yapı olan homo veya heteromultimerli nanokorlar, hedefe yönelik ilaç salımı/taşınması, hastalık tanı ve tedavisi, biyogörüntüleme, tarım ve bitki koruma sistemlerinde yüksek performanslı nanobiyoteknolojik test kitleri geliştirilmesinde değerlendirilmektedir (Wang ve ark., 2016).

Biyoteknolojik Ar-Ge Araçları

Nanokorlar multi-fonksiyonel özellikleri sayesinde, afinite, saflaştırma, immüno-presipitasyon, şaperon destekli kristalizasyon, protein degradasyonu, gen aktivasyonu ve /veya inaktivasyonu, protein-protein etkileşimi gibi değişik araçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. İntrinsik stabiliteleri ve monomerik doğa ve katı substratlara kolay immobilizasyon nitelikleri nanokorları biyomolekül saflaştırma yöntemlerinde ideal ligand adayları kılmaktadır. Tipik antikorlarla karşılaştırıldıklarında ise, nanokorlar yüksek sütun rejenerasyon kapasiteleri ile destek materyallerin birim miktarı (g) başına artan oranda paratop üretebilmekte ve daha seyrek elüsyon koşullarında etkili olabilmektedirler (Duc ve ark., 2012).

Nanokorlar, özgül afinite güçleri sayesinde transkripsiyon faktörü bağlama bölgeleri ile modifiye edici proteinlerin saptanmasını kolaylaştırmaktadırlar (De Meyer ve ark., 2014; de Beer ve Giepmans, 2020). Nanokor DNA'sı diğer cDNA'lar ile entegre edilebilmektedir. Bu sayede, nanokor problemler geliştirilebilmiştir. Nanokor problemler, multi-domain proteinlerin tasarımında ve , hücre endojen proteini tespitinde yardımcı olmaktadır (Rasmussen ve ark., 2011). Nanokorların, aktif enzimatik bölgeler veya ligand/reseptör bağlama boşlukları hedefleme kabiliyetlerinin yüksekliği ve şaperon şeklinde davranışları sayesinde X-ışını kristalografisi tekniğinde karmaşık yapı proteinlerin yapısal analizini kolaylaştırmaktadırlar. Bu sebeple, kristalizasyon süreci ve membran proteinlerin yapısal detaylarını aydınlatmakta tercih edilmektedirler (Baranova ve ark., 2012; Prole ve Taylor, 2019).

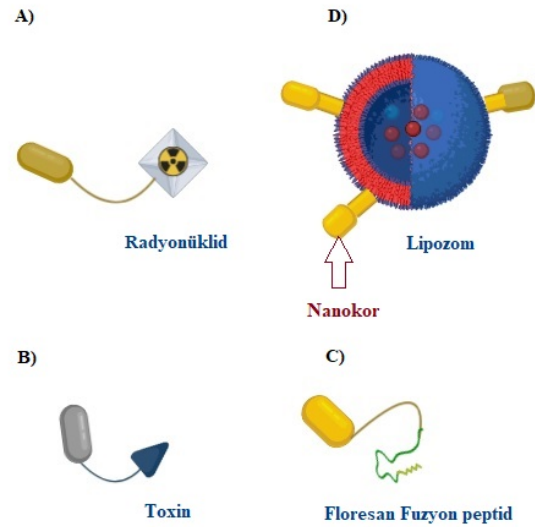
Nanokorlar: Güçlü Biyogörüntüleme Reaktifleri

Hücre içi proteinlerin konumları ve işlevselliklerini yeniden düzenlemek ve/veya değiştirmek ile hücre fizyolojisinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmak önemlidir. Antikorlar, sabit ve geçirgen hücrelerde protein konumlarını tanımlamak için kullanılabilirler. Örneğin, Devegil familyası antikorlarından türetilen nanokorlar küçük protein tabanlı bağlayıcılar olarak umut vermektedirler. Yaklaşık 12-15 kDa boyutundaki nanokorlar, plazmitler tarafından kodlanabilir, hücrelerde eksprese edilebilir ve çoğu biyolojik bariyerden kolaylıkla geçebilirler. Bu özellikleri sebebiyle, hücre içi fonksiyonel sinyal molekülleri ve kanser biyobelirteçlerine karşı, genomik ve postgenomik amaçlı kullanılmaktadırlar (Clift ve ark., 2017; Rodriguez ve ark., 2017).

Nanokor üretmek zaman alıcı ve maliyetli olmakla birlikte, her zaman başarılı sonuçlanmayabilmektedir. Bu engeli aşmak için floresan etiketli protein yapılar tercih edilmektedir. Floresan protein füzyon veya anti- Green Fluorescent Protein (GFP) nanokorlar kullanılarak, nano tabanlı biyogörüntüleme izleyicileri geliştirilmiştir. Floresan işaretli proteinin nanokor ile genetik füzyonu, hedefin konformasyonel varyantlarını tespit etmek, farklı

organellerde translokasyon ve lokalizasyon değişimlerini izlemek ve de görüntülemek mümkün olmaktadır (Stewart-Ornstein ve Lahav, 2016; Yu ve ark., 2021).

Nanokorlar, *in vivo* tespit problemleri olarak, kanser, bulaşıcı hastalıklar, aterosklerotik lezyonlar, inflamatuvar yanıt ve pre-klinik/klinik araştırmalarda kullanılmaktadır. Düşük moleküler ağırlıkları ve boyutları renal klerans (açıklık) sınırından küçük olduğu için kan dolaşımından hızla uzaklaştırılabilmektedir (Ge ve ark., 2021). Bu nedenle, nanokorların ekstravazasyonlarını, tümör penetrasyonunu ve renal klerans hızlandırmaktadır. Sonuç olarak, nanokorlar, vücuda enjeksiyon sonrası birkaç saat içinde hedefine varmakta, bu sayede doku/organ /hücre içi organelleri hassas ve doğru biçimde *in vivo* görüntülenebilmektedir (Görsel 1) (Bao ve ark., 2021).



Görsel 1. Hastalık tanı ve tedavisinde uygulanan bazı *in vivo* nanokor problemler (Bao ve ark., 2021)

Figure 1. Some *in vivo* nanobody probes applied in disease diagnosis and treatment

Radyonüklid etiketli nanokorlar, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (CT) uygulamalarında, *in vivo* tümörlerin görüntülenmesinde tercih edilmektedirler. Anti-Macrophage Mannose Receptor (MMR) nanokorları, makrofaj polarizasyonunu görüntüleme, ateroskleroz ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıkların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Broisat ve ark., 2012; Gonzalez ve ark., 2017).

Nanokorlar, tıpkı bir madalyonun iki yüzüne benzemektedirler. Eliza testinde, adsorptif substratlar ile kaplanırlarsa, antijen-prob interaksiyonlarını etkileyebilmektedirler. Nanokorlar, IgG yapı ile karşılaştırıldığında, adsorplayıcı substratlar üzerine kaplanırlarsa, paratopları adsorbe edici yüzeyin çevresine çok yakınlaşırlar ve antijen-prob etkileşimini engellerler (Jeevanandam ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2021).

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, nano-biyoteknolojik yaklaşımların özellikle biyomedikal ve sağlık alanlarında uygulama fırsatları ve gelişim potansiyelleri derlenmiştir. Bu bağlamda, nanoteknoloji ve uygulama alanlarından

başlayarak, nanobiyoteknolojinin gelişimi, Global nanobiyoteknoloji pazarı, nanobiyoteknolojilerin sınıflandırılması ile nanobiyoteknolojik araçlar ve uygulama alanları üzerinde durulmuştur.

Nanoteknoloji, çağımızda üniversiteleri, endüstrileri ve yasal otoriteleri etkileyen küresel bir mültidisipliner teknik alandır. Henüz başlangıç safhasında olmakla birlikte, gelişimini baş döndürücü hızla sürdürmektedir. Nanoteknoloji ve biyoteknoloji disiplinlerinin birleşimi olan nanobiyoteknoloji ise özellikle biyomedikal ve tıp sahalarında novel malzemelerin ve yöntemlerin geliştirilmesi için araştırmacılara sayısız fırsatlar sunmaktadır. Daha hızlı, güvenilir ve hassas test ana tanı sistemlerinin geliştirilmesinde, biyonomalzemelerin intrasellüler yapılar, süreçler ve çevre ile etkileşimlerini kavramamızı sağlayacak bulguların elde edilmesinde, pikomolar afinite ve farklı hedeflere yüksek seçici bağlayıcıların araştırılmasında, yüzey işlevselleştirme, boyut, fiziksel özellikler ve endositoz nanopartikül makinelerin dizaynında, afinite saflaştırma, immünopresipitasyon, şaperon destekli kristalizasyon, protein degradasyonu, gen aktivasyonu veya inaktivasyonu, protein-protein etkileşimi, sellüler biyogörüntüleme, *in vivo* ve *in vitro* hastalık teşhisi, hedefe dönük terapötikler, zirai ve bitki koruma ile gıda analizi başlıkları altında gelecek vaat ettiği görülmektedir. Ayrıca, akıllı ilaç dağıtımı, kanser ve gen tedavisi ile biyo-uyumlu nanocihazların geliştirilmesinde etkili olduğu görülmektedir. Bu derleme çalışması, yakın gelecekte küresel boyutta sürdürülebilir bir dünya açısından Nanobiyoteknolojinin önemini ortaya koymuştur. Bu sebeple, araştırmaların ülkemiz bazında küresel politikalar ve araştırma öncelikleri ile eş zamanlı sürdürülmesinin gerekliliği anlaşılmaktadır. Bu ise her alanda doğal kaynakların etkin ve verimli değerlendirilmesinin önünü açacaktır.

Sonuç olarak, biyoteknolojinin gelecekte artan şekilde gelişme göstermesi kuvvetle muhtemel olup, nanoteknoloji ile birleşmesi ise insanlığı sürdürülebilir bir geleceğe daha yaklaştırmaktadır. Aynı zamanda, nano tabanlı teknolojiler konvansiyonel tekniklere oranla daha düşük maliyetlidirler. Bu sebeple, nano-biyoteknolojinin teşvik edilmesi ve bu sayede küresel ekonominin doğal kaynakların da etkin kullanıyla sağlıklı ve refaha dönük devamı gerekmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar, bu makalenin yayınlanması ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

- Akhshabi, S., Biazar, E., Singh, V., Heidari Keshel, S., & Geetha, N. (2018). The effect of the carbodiimide cross-linker on the structural and biocompatibility properties of collagen-chondroitin sulfate electrospun mat. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4405–4416. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165739>
- Alavi, M., & Hamidi, M. (2019). Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug metabolism and personalized therapy*, 34(1), 10.1515/dmpt-2018-0032. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032>
- Alavi, M., & Nokhodchi, A. (2020). An overview on antimicrobial and wound healing properties of ZnO nanobiofilms, hydrogels, and bionanocomposites based on cellulose, chitosan, and alginate polymers. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115349>
- Ali, M. A., Rehman, I., Iqbal, A., Din, S., Rao, A. Q., Latif, A., Samiullah, T. R., Azam, S., & Husnain, T. (2014). Nanotechnology: a New Frontier in Agriculture. *Advancements in Life Sciences*, 1, 129-138.
- Alshora, D. H., Ibrahim, M. A., & Alanazi, F. K. (2016). Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*, 3, 163–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42861-3.00006-6>
- Alvarado, K., Bolaños, M., Camacho, C., Quesada, E., & Vega-Baudrit, J. (2019). Nanobiotechnology in Agricultural Sector: Overview and Novel Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 10(02), 120–141. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2019.102007>
- Anis, H. A. (2019). Gene therapy in the era of nanotechnology/a review of current data. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 10(1), 1-2. <https://doi.org/10.15406/jcpcr.2019.10.00380>
- Bao, G., Tang, M., Zhao, J., & Zhu, X. (2021). Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy. *EJNMMI Research*, 11(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00750-5>
- Baranova, E., Fronzes, R., Garcia-Pino, A., Van Gerven, N., Papapostolou, D., Péhau-Arnaudet, G., Pardon, E., Steyaert, J., Howorka, S., & Remaut, H. (2012). SbsB structure and lattice reconstruction unveil Ca²⁺ triggered S-layer assembly. *Nature*, 487(7405), 119–122. <https://doi.org/10.1038/nature11155>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Bokhari, H. (2018). Exploitation of microbial forensics and nanotechnology for the monitoring of emerging pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(4), 504–521. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2018.1444013>
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 24–36. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00044-3)
- Broisat, A., Hernot, S., Toczek, J., De Vos, J., Riou, L. M., Martin, S., Ahmadi, M., Thielens, N., Wernery, U., Caveliers, V., Muyldermans, S., Lahoutte, T., Fagret, D., Ghezzi, C., & Devoogdt, N. (2012). Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions. *Circulation Research*, 110(7), 927–937. <https://doi.org/10.1161/circresaha.112.265140>
- Chan, K. H., & Tay, J. J. J. (2019). Advancement of Peptide Nanobiotechnology via Emerging Microfluidic Technology. *Micromachines*, 10(10), 627. <https://doi.org/10.3390/mi10100627>
- Chen, J., Guo, Z., Tian, H., & Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16023. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.23>
- Clift, D., McEwan, W. A., Labzin, L. I., Konieczny, V., Mogessie, B., James, L. C., & Schuh, M. (2017). A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. *Cell*, 171(7), 1692-1706.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.033>

- Crommelin, D. J., Storm, G., Jiskoot, W., Stenekes, R., Mastrobattista, E., & Hennink, W. E. (2003). Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 87(1-3), 81–88. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(03\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00014-2)
- Danie Kingsley, J., Ranjan, S., Dasgupta, N., & Saha, P. (2013). Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *Journal of Pharmacy Research*, 7(2), 200–204.
- de Beer, M. A., & Giepmans, B. N. G. (2020). Nanobody-Based Probes for Subcellular Protein Identification and Visualization. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 573278. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.02.021>
- De Meyer, T., Muyldermans, S., & Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.001>
- de Morais, M. G., Martins, V. G., Steffens, D., Pranke, P., & da Costa, J. A. (2014). Biological applications of nanobiotechnology. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 1007–1017. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.8748>
- Duc, T. N., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Saerens, D., Peeters, E., Charlier, D., & Muyldermans, S. (2012). Nanobody-Based Chromatin Immunoprecipitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 911, 491–505. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_31
- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101–2141. <https://doi.org/10.1021/mp200394t>
- Dutt, Y., Pandey, R. P., Dutt, M., Gupta, A., Vibhuti, A., Vidic, J., Raj, V. S., Chang, C. M., & Priyadarshini, A. (2023). Therapeutic applications of nanobiotechnology. *Journal of nanobiotechnology*, 21(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01909-z>
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19200–19213. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06459-2>
- Fathi-Achachelouei, M., Knopf-Marques, H., Ribeiro da Silva, C. E., Barthès, J., Bat, E., Tezcaner, A., & Vrana, N. E. (2019). Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 113. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00113>
- Freitas, R. A. (2005). Current status of nanomedicine and medical nanorobotics. *Current Status of Nanomedicine and Medical Nanorobotic*, 2, 1–25. <https://doi.org/10.1166/jctn.2005.01>
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 601626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
- Ge, S., Li, J., Yu, Y., Chen, Z., Yang, Y., Zhu, L., Sang, S., & Deng, S. (2021). Review: Radionuclide Molecular Imaging Targeting HER2 in Breast Cancer with a Focus on Molecular Probes into Clinical Trials and Small Peptides. *Molecules*, 26(21), 6482. <https://doi.org/10.3390/molecules26216482>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Giret, S., Wong Chi Man, M., & Carcel, C. (2015). Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *Chemistry – a European Journal*, 21(40), 13850–13865. <https://doi.org/10.1002/chem.201500578>
- Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A., & Tabares-da Rosa, S. (2017). Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Frontiers in Immunology*, 8, 977. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00977>
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. D., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Han, S., Zou, J., Xiao, F., Xian, J., Liu, Z., Li, M., Luo, W., Feng, C., & Kong, N. (2024). Nanobiotechnology boosts ferroptosis: opportunities and challenges. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 606. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02842-5>
- Han, S., Zou, J., Xiao, F., Xian, J., Liu, Z., Li, M., Luo, W., Feng, C., & Kong, N. (2024). Nanobiotechnology boosts ferroptosis: opportunities and challenges. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 606. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02842-5>
- Hasan, A., Morshed, M., Memic, A., Hassan, S., Webster, T., & Marei, H. (2018). Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 5637–5655. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153758>
- Helma, J., Cardoso, M. C., Muyldermans, S., & Leonhardt, H. (2015). Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *Journal of Cell Biology*, 209(5), 633–644. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409074>
- Hernández, N. P., Juanes-Velasco, P., Landeira-Viñuela, A., Bareke, H., Montalvillo, E., Góngora, R., & Fuentes, M. (2021). Restoring the Immunity in the Tumor Microenvironment: Insights into Immunogenic Cell Death in Onco-Therapies. *Cancers*, 13(11), 2821. <https://doi.org/10.3390/cancers13112821>
- Huang, H., Jiang, C. T., Shen, S., Liu, A., Gan, Y. J., Tong, Q. S., Chen, S. B., Gao, Z. X., Du, J. Z., Cao, J., & Wang, J. (2019). Nanoenabled Reversal of IDO1-Mediated Immunosuppression Synergizes with Immunogenic Chemotherapy for Improved Cancer Therapy. *Nano Letters*, 19(8), 5356–5365. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01807>
- Jain K. K. (2020). Role of Nanobiotechnology in Drug Delivery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2059, 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_2
- Jampilek, J., & Placha, D. (2021). Advances in Use of Nanomaterials for Musculoskeletal Regeneration. *Pharmaceutics*, 13(12), 1994. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121994>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jiang, T., Li, Q., Qiu, J., Chen, J., Du, S., Xu, X., Wu, Z., Yang, X., Chen, Z., & Chen, T. (2022). Nanobiotechnology: Applications in Chronic Wound Healing. *International journal of nanomedicine*, 17, 3125–3145. <https://doi.org/10.2147/IJN.S372211>
- Jiang, T., Li, Q., Qiu, J., Chen, J., Du, S., Xu, X., Wu, Z., Yang, X., Chen, Z., & Chen, T. (2022). Nanobiotechnology: Applications in Chronic Wound Healing. *International journal of nanomedicine*, 17, 3125–3145. <https://doi.org/10.2147/IJN.S372211>
- Jurj, A., Braicu, C., Pop, L. A., Tomuleasa, C., Gherman, C. D., & Berindan-Neagoe, I. (2017). The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug design, development and therapy*, 11, 2871–2890. <https://doi.org/10.2147/ddt.s142337>

- Kaur, K., & Thombre, R. (2021). Nanobiotechnology: methods, applications, and future prospects. In *Elsevier eBooks* (ss. 1–20). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822878-4.00001-8>
- Khan, I., Khan, M., Umar, M. N., & Oh, D. H. (2015). Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET nanobiotechnology*, 9(6), 396–400. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0062>
- Kim, B. Y., Rutka, J.T., & Chan, W. C. (2010). Nanomedicine. *NEJM*, 363(25): 2434–2443.
- Kompella, U. B., Amrite, A. C., Pacha Ravi, R., & Durazo, S. A. (2013). Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. *Progress in Retinal and Eye Research*, 36, 172–198. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.04.001>
- Kozma, G. T., Shimizu, T., Ishida, T., & Szebeni, J. (2020). Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nanopharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.024>
- Lugani, Y., Sooch, B. S., Singh, P., & Kumar, S. (2021). Nanobiotechnology applications in food sector and future innovations. *Microbial Biotechnology in Food and Health*, 197–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00008-6>
- Maine, E., Thomas, V., & Utterback, J. (2014). Radical innovation from the confluence of technologies: Innovation management strategies for the emerging nanobiotechnology industry. *Journal of Engineering and Technology Management*, 32, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jengtecman.2013.10.007>
- Mainini, F., De Santis, F., Fucà, G., Di Nicola, M., Rivoltini, L., & Eccles, M. (2021). Nanobiotechnology and Immunotherapy: Two Powerful and Cooperative Allies against Cancer. *Cancers*, 13(15), 3765. <https://doi.org/10.3390/cancers13153765>
- Malhotra, M., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Intranasal Delivery of Chitosan–siRNA Nanoparticle Formulation to the Brain. *Methods in Molecular Biology*, 1141, 233–247. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4_15
- Market Research Future. (2024, Ekim). *Nanomaterials Market Research Report*. Erişim tarihi: 25.10.2024 [<https://www.marketresearchfuture.com>]
- Mirón-Barroso, S., Domènech, E. B., & Trigueros, S. (2021). Nanotechnology-Based Strategies to Overcome Current Barriers in Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8537. <https://doi.org/10.3390/ijms22168537>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Na, K., & Bae, Y. H. (2002). Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: characterization, aggregation, and adriamycin release in vitro. *Pharmaceutical research*, 19(5), 681–688. <https://doi.org/10.1023/a:1015370532543>
- Nishiyama, N., Matsumura, Y., & Kataoka, K. (2016). Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers. *Cancer Science*, 107(7), 867–874. <https://doi.org/10.1111/cas.12960>
- Pandey, P., Purohit, D., & Dureja, H. (2018). Nanosponges –A Promising Novel Drug Delivery System. *Recent Patents on Nanotechnology*, 12(3), 180–191. <https://doi.org/10.2174/1872210512666180925102842>
- Parisi, C., Vigani, M., & Rodríguez-Cerezo, E. (2015). Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, 10(2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.009>
- Patel, S. S., & Patel, P. N. (2023). A brief review on nanorobotics applications in medicine and future prospects. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 19–28. <https://doi.org/10.52711/2231-5659.2023.00004>
- Patel, S. S., & Patel, P. N. (2023). A brief review on nanorobotics applications in medicine and future prospects. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 19–28. <https://doi.org/10.52711/2231-5659.2023.00004>
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2019). A genetically encoded toolkit of functionalized nanobodies against fluorescent proteins for visualizing and manipulating intracellular signalling. *BMC Biology*, 17(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0662-4>
- Pugliese, R., & Gelain, F. (2017). Peptidic Biomaterials: From Self-Assembling to Regenerative Medicine. *Trends in Biotechnology*, 35(2), 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.09.004>
- Qiu, Q., Ding, X., Chen, J., Chen, S., & Wang, J. (2023). Nanobiotechnology-based treatment strategies for malignant relapsed glioma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 358, 681–705. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.05.016>
- Qiu, Q., Ding, X., Chen, J., Chen, S., & Wang, J. (2023). Nanobiotechnology-based treatment strategies for malignant relapsed glioma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 358, 681–705. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.05.016>
- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(2), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4>
- Ram, P., Vivek, K., & Kumar, S. P. (2014). Nanotechnology in sustainable agriculture: Present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology*, 13(6), 705–713. <https://doi.org/10.5897/AJBX2013.13554>
- Rasmussen, S. G. F., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., DeVree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), 175–180. <https://doi.org/10.1038/nature09648>
- Rodriguez, E. A., Campbell, R. E., Lin, J. Y., Lin, M. Z., Miyawaki, A., Palmer, A. E., Shu, X., Zhang, J., & Tsien, R. Y. (2017). The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.010>
- Saeed, R. M., Dmour, I., & Taha, M. O. (2020). Stable Chitosan-Based Nanoparticles Using Polyphosphoric Acid or Hexametaphosphate for Tandem Iontropic/Covalent Crosslinking and Subsequent Investigation as Novel Vehicles for Drug Delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 24, 4–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00004>
- Sahoo, S. K., & Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*, 8(24), 1112–1120. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02903-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02903-9)
- Schudel, A., Francis, D. M., & Thomas, S. N. (2019). Material design for lymph node drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 4(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0110-7>
- Shahcheraghi, N., Golchin, H., Sadri, Z., Tabari, Y., Borhanifar, F., & Makani, S. (2022). Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. *Biotech*, 12(3), 65. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03108-9>

- Sharp, P. A., & Langer, R. (2011). Promoting Convergence in Biomedical Science. *Science*, 333(6042), 527–527. <https://doi.org/10.1126/science.1205008>
- Shrestha, S., & Bhattacharya, S. (2020). Versatile Use of Nanosponge in the Pharmaceutical Arena: A Mini-Review. *Recent Patents on Nanotechnology*, 14(4), 351–359. <https://doi.org/10.2174/1872210514999200901200558>
- Siontorou, C. G. (2013). Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4215–4227. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39428>
- Stewart-Ornstein, J., & Lahav, G. (2016). Dynamics of CDKN1A in Single Cells Defined by an Endogenous Fluorescent Tagging Toolkit. *Cell Reports*, 14(7), 1800–1811. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.045>
- Sudhakar, C., Upadhyay, N., Verma, A., Jain, A., Narayana Charyulu, R., & Jain, S. (2015). Nanomedicine and Tissue Engineering. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00001-7>
- Swain, P. S., Rajendran, D., Rao, S. B. N., & Dominic, G. (2015). Preparation and effects of nano mineral particle feeding in livestock: A review. *Veterinary World*, 8(7), 888–891. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.888-891>
- Takeda, Y., Mae, S., Kajikawa, Y., & Matsushima, K. (2009). Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. *Scientometrics*, 80(1), 23–38. <https://doi.org/10.1007/s11192-007-1897-3>
- Tang, L., Fu, C., Zhang, A., Li, X., Cao, Y., Feng, J., Liu, H., Dong, H., & Wang, W. (2023). Harnessing nanobiotechnology for cerebral ischemic stroke management. *Biomaterials science*, 11(3), 791–812. <https://doi.org/10.1039/d2bm01790c>
- Towards Healthcare. (2024, Ekim). *Nanomedicine Market Size Envisioned at USD 562.93 Billion by 2032*. Erişim tarihi: 25.10.2024 [<https://www.towardshealthcare.com/insights/nanomedicine-market-sizing#:~:text=The%20nanomedicine%20market%20size%20achieved,10.1%25%20from%202024%20to%202032>]
- Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., & Skrabalak, S. E. (2009). Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(1), 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>
- Viktor, F., Emese, B., Geza, J., & Istvan, A. (2016). Formulation aspects of nanopharmaceuticals and nanotechnology I Introduction, biopharmaceutical aspects. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 86(2), 43–52.
- Wang, J., & Shapira, P. (2009). Partnering with universities: a good choice for nanotechnology start-up firms? *Small Business Economics*, 38(2), 197–215. <https://doi.org/10.1007/s11187-009-9248-9>
- Wang, Y., Fan, Z., Shao, L., Kong, X., Hou, X., Tian, D., Sun, Y., Xiao, Y., & Yu, L. (2016). Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3287–3303. <https://doi.org/10.2147/ijn.s107194>
- Wang, T., Zhang, X., Xu, Y., Xu, Y., Zhang, Y., & Zhang, K. (2022). Emerging nanobiotechnology-encoded relaxation tuning establishes new MRI modes to localize, monitor and predict diseases. *Journal of materials chemistry. B*, 10(37), 7361–7383. <https://doi.org/10.1039/d2tb00600f>
- Xian, H., Zhang, Y., Yu, C., & Wang, Y. (2023). Nanobiotechnology-Enabled mRNA Stabilization. *Pharmaceutics*, 15(2), 620. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020620>
- Yamada, Y., & Harashima, H. (2014). A method for screening mitochondrial fusogenic envelopes for use in mitochondrial drug delivery. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1141, 57–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4_2
- Youssef, F. S., El-Banna, H. A., Elzorba, H. Y., & Galal, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 78–93. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1691379>
- Yu, S., Xiong, G., Zhao, S., Tang, Y., Tang, H., Wang, K., Liu, H., Lan, K., Bi, X., & Duan, S. (2020). Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(2), 444–454. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4817>
- Zhao, L., Liu, C., Xing, Y., He, J., O'Doherty, J., Huang, W., & Zhao, J. (2021). Development of a ^{99m}Tc-Labeled Single-Domain Antibody for SPECT/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Cancer. *Molecular pharmaceutics*, 18(9), 3616–3622. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00569>
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>