



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ZEYTİNYAĞI ENDÜSTRİSİ ATIK
ÜRÜNLERİNDEN FENOLİK BİLEŞENLERİN
EKSTRAKSİYONU VE GIDA ÜRÜNLERİNDE
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Emine ESEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Eylül-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Emine ESEN tarafından hazırlanan “ZEYTİNYAĞI ENDÜSTRİSİ ATIK ÜRÜNLERİNDEN FENOLİK BİLEŞENLERİN EKSTRAKSİYONU VE GIDA ÜRÜNLERİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması 16/09/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

Danışman

Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL

.....

Üye

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

Üye

Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL

.....

Üye

Doç. Dr. Talha DEMİRCİ

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Emine ESEN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİNYAĞI ENDÜSTRİSİ ATIK ÜRÜNLERİNDEN FENOLİK BİLEŞENLERİN EKSTRAKSİYONU VE GIDA ÜRÜNLERİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine ESEN

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL

2024, 101 Sayfa

Jüri

**Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL
Prof. Dr. Ahmet ÜNVER
Doç. Dr. Talha DEMİRCİ**

Zeytinyağı üretimi esnasında biyoaktif bileşenlerce zengin pirina ve karasu olarak adlandırılan atık ve atık ürünler açığa çıkmaktadır. Bu çalışmada, pirina ve karasu içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu, karakterizasyonu, fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve akabinde fırıncılık ürünlerinde fonksiyonel katkı olarak kullanılabilirliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda, pirina ve karasu fenolik bileşenleri etanolik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve fenolik bileşenlerin kalitatif ve kantitatif incelenmesi LC-MS/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ürünlerin antioksidan özellikleri 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikalinin inhibisyonu (DPPH), 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit radikalinin inhibisyonu (ABTS) ve ferrik iyonlarını indirgeme kuvveti (FRAP) yöntemleri ile spektrofotometrik olarak; gıda kaynaklı ve insan patojeni bazı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal kapasiteleri ise disk difüzyon ve kuyucuk yöntemleri ile belirlenmiştir. Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının fenolik içeriklerinin sırasıyla %5.45 ve %2.41 oldukları tespit edilmiştir. Pirina etanolik ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin karasu muadillerine kıyasla istatistiksel olarak ($p<0.05$) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. LC-MS/MS analizi sonucunda pirina etanolik ekstraktında 26 adet, karasu etanolik ekstraktında ise 20 adet fenolik bileşiğe rastlanılmıştır. Pirina etanolik ekstraktında baskın fenolik bileşiğin luteolin (458.65 ng/mg), karasu etanolik ekstraktında ise 3-hidroksitrosol (109.55 ng/mg) olduğu tespit edilmiştir. Bazı maya, küf ve bakteriler üzerine antimikrobiyal etkilerini incelediğimiz analiz sonucunda (disk difüzyon ve kuyucuk yöntemi) her iki ekstraktında çalışmaya dahil edilen maya ve küfler üzerine herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı, ancak çalışmaya dahil edilen bakteriler üzerine ise farklı düzeylerde etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Akabinde elde edilen ekstraktlar, ekmek üretimine fonksiyonel bileşen olarak farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %2) ilave edilmiş ve duyuşal açıdan genel beğeni puanı kabul edilebilir düzeyde olan ekmek örnekleri besinsel (nem, kül, yağ, protein, diyet lifi, fenolik madde), fiziksel (ağırlık, hacim, spesifik hacim), tekstürel (TPA analizi) ve fonksiyonel (antioksidan kapasiteleri glisemik indeks değerleri) özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Artan etanolik ekstrakt miktarına bağlı olarak ekmeklerin duyuşal özelliklerinde önemli bir düşüş olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, %0.5, %1, %2 pirina etanolik ekstrakt ve %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin duyuşal açıdan kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ekmek örneklerinin tekstür analiz sonuçları incelendiğinde ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça sertlik, sakızimsılık ve çignenebilirlik parametrelerinde artış, kohesiflik değerinde ise azalış gözlemlenmiştir. Artan fenolik ekstrakt miktarıyla birlikte, ekmek örneklerinin toplam fenolik ve antioksidan kapasitelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen veriler, zeytinyağı endüstrisi artık ve atık ürünleri olan pirina ve karasuyun, fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir biyoaktif bileşenlerin (fenolik bileşenlerin) üretimi için hammadde olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: antioksidan aktivite, ekmeğ, fenolik bileşik, karasu, pirina



ABSTRACT

MS THESIS

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE BYPRODUCTS OF OLIVE OIL INDUSTRY AND INVESTIGATION OF THEIR USABILITY IN FOOD PRODUCTS

Emine ESEN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN FOOD ENGINEERING**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yunus Emre TUNÇİL

2024, 101 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Yunus Emre TUNÇİL

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Assoc. Prof. Dr. Talha DEMİRCİ

Olive pomace and blackwater are important byproducts of olive oil industry, which are rich in bioactive components. In this study, it was aimed to extract, characterize and determine the functional properties of phenolic compounds in pomace and blackwater and then to investigate their usability as functional ingredients in bakery products. For these purposes, phenolic compounds of pomace and blackwater were extracted using ethanolic extraction method and qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds were carried out using LC-MS/MS. The antioxidant properties of the products were determined spectrophotometrically through 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 2,2-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid radical (ABTS) and ferric ion reducing power (FRAP) assays; antimicrobial capacities of the products against some foodborne and human pathogenic microorganisms were determined through disk diffusion and well methods. The phenolic contents of pomace and blackwater ethanolic extracts were found to be 5.45% and 2.41%, respectively. The antioxidant capacities of pomace ethanolic extracts were found to be statistically ($p < 0.05$) higher than those of their blackwater counterparts. LC-MS/MS analysis revealed 26 phenolic compounds in pomace ethanolic extract and 20 phenolic compounds in blackwater ethanolic extract. Luteolin (458.65 ng/mg) was found to be the dominant phenolic compound in pomace ethanolic extract and 3-hydroxytyrosol (109.55 ng/mg) in blackwater ethanolic extract. As a result of the analysis of antimicrobial effects on some yeasts, molds and bacteria (disk diffusion and well method), it was concluded that both extracts did not have any antimicrobial effect on yeasts and molds, but showed different levels of effect on bacteria tested.

Subsequently, the extracts were added at different ratios (0.5%, 1% and 2%) as functional ingredients in bread formulation and the bread samples with an acceptable overall sensory score were evaluated for their nutritional (moisture, ash, fat, protein, dietary fiber, phenolic matter), physical (weight, volume, specific volume), textural (TPA analysis) and functional (antioxidant capacity and glycemic index values) properties. Although it was determined that there was a significant decrease in the sensory properties of the breads due to the increasing amount of ethanolic extract, it was determined that the bread samples with 0.5%, 1%, 2% pomace ethanolic extract and 0.5% blackwater ethanolic extract were at an acceptable level in terms of sensory properties. When the texture analysis results were analyzed, it was observed that the hardness, chewiness and chewyness parameters increased and the cohesiveness value decreased as the amount of ethanolic extract added increased. It was determined that the total phenolic and antioxidant capacities of bread samples increased with increasing phenolic extract amount. The data

obtained show that pomace and blackwater, which are residual and waste products of olive oil industry, can be used as raw materials for the production of bioactive components (phenolic components) that can be used in functional food production.

Keywords: antioxidant activity, bread, phenolic compound, waste water, pomace



ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını, desteğini ve fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve tüm bu zorlu süreçte bilgilerini benimle paylaşan her zaman ve her konuda bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her konuda beni destekleyen ilgi ve sevgilerini hiç esirgemeyen, dualarıyla yanımda olan canım babam Mustafa ESEN ve canım annem Feride ESEN'e en büyük destekçilerim olan abilerim Hüseyin ve İsmail ESEN'e ve ablam Meryem KILIÇ'a,

Gerek laboratuvarıda gerekse normal hayatımda yardımlarını ve desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Tekmile CANKURTARAN KÖMÜRCÜ 'ye,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ÇELİK'e ve arkadaşlarım İhsan SARIOĞLAN ve Dr. Zühal ALKAY 'a,

Liseden beri her daim yanımda olan ve bu zorlu tez sürecimde tüm kahrımı çeken canım dostlarım; Şeyma ACAR, Büşra Betül KIRDI ve Merve ATEŞ'e

2210422 no'lu TÜBİTAK 1001 projesi ile bu çalışmayı destekleyerek proje süresince burs imkanı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürü borç bilirim.

Emine ESEN
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Zeytin	4
2.2. Zeytinyağı	5
2.3. Fenolik Bileşenler, Fonksiyonel Özellikleri ve Zeytin Fenolikleri	8
2.4.Ekmek	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Karasu ve pirina örneklerinin ayrılması ve muhafazası.....	14
3.2.2. Karasudan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu (etanolik ekstrakt)	15
3.2.3. Pirinadan fenolik bileşenlerin eldesi.....	15
3.3. Ekstraktta Yapılan Analizler.....	16
3.3.1. Protein analizi	16
3.3.2. Kül analizi.....	17
3.3.3. Toplam fenolik madde analizi	17
3.3.4.Antioksidan aktivite analizi	18
3.3.6. LC-MS/MS ile fenolik bileşenlerin analizi.....	22
3.3.7 ICP-MS (indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi) ile mineral madde tayini	22
3.4. Fenolik Bileşen İlaveli Ekmek Üretimi	22
3.4.1 Ekmekte yapılan analizler.....	23
3.4.1.1 Duyusal analiz.....	23
3.4.1.2. Hamur reolojisi	23
3.4.1.3. Nişasta fraksiyonlarının (hızlı sindirilen, yavaş sindirilen ve dirençli nişasta) belirlenmesi ve glisemik indeks değerlerinin <i>in vitro</i> şartlar atında hesaplanması	24
3.4.1.11. Nem analizi	26
3.4.1.12. Kül analizi.....	26
3.4.1.13. Yağ analizi	27
3.4.1.14. Protein analizi	27
3.4.1.4. Enerji (kalori) değerlerinin hesaplanması.....	27

3.4.1.5. Ağırlık hacim spesifik hacim ve kabuk kalınlıklarının belirlenmesi.....	28
3.4.1.6. Ekmek örneklerinin kabuk ve iç renk değerlerinin belirlenmesi.....	28
3.4.1.7. Ekmek örneklerinin tekstürel özelliklerinin belirlenmesi.....	28
3.4.1.8. Ekstrakte edilmiş olan fenolik bileşenlerin ekmeğin küflenmesine etkisinin belirlenmesi.....	29
3.4.1.9. Fenolik madde analizi.....	29
3.4.1.10. Antioksidan analizleri.....	30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	32
4.1. Ekstraktların Besinsel Kompozisyonu.....	32
4.1.1. Protein, kül, basit şeker ve toplam fenolik madde analiz sonucu.....	32
4.1.2. Antioksidan aktivite analizleri.....	34
4.1.3. Antimikrobiyal aktivite analizleri.....	37
4.1.4 LC-MS/MS ile fenolik bileşen analiz sonucu.....	42
4.1.5. ICP-MS ile mineral madde analiz.....	47
4.2. Pirina ve Karasu Etanolik Ekstraktlarını İçeren Fonksiyonel Ekmek Üretimi....	48
4.2.1 Farklı oranlarda ekstrakt içeren ekmek örneklerinin duyusal analizleri (ön deneme).....	49
4.2.2. Duyusal açıdan kabul edilebilir oranda etanolik ekstrakt içeren ekmek hamurlarının reolojik özellikleri.....	55
4.2.2.1. Fenolik bileşen ilaveli ekmek besinsel kompozisyonu.....	61
4.2.2.2. Nişasta fraksiyonları ve glisemik indeks değerleri.....	62
4.2.2.3. Diyet lifi içerikleri.....	65
4.2.2.4. Enerji (kalori) değerinin hesaplanması.....	66
4.2.2.5. Fenolik madde analiz sonucu.....	66
4.2.2.5.1. Serbest fenolik madde analiz sonucu.....	67
4.2.2.5.2. Bağlı fenolik madde analiz sonucu.....	67
4.2.2.5.3. Toplam fenolik madde analiz sonucu.....	68
4.2.2.6. Antioksidan aktivite analizleri.....	69
4.2.2.7. Ekmek ağırlık hacim spesifik hacim ve kabuk kalınlığı analiz.....	70
4.2.2.8. Ekmek kabuk ve iç renk analiz sonuçları.....	72
4.2.2.9. Tekstür analiz sonuçları.....	73
4.2.2.10. Mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	80
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	83
5.1 Sonuçlar.....	83
5.2 Öneriler.....	85
6. KAYNAKLAR.....	86
EKLER.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a* : (+) kırmızı, (-) yeşil renk değeri

b* : (+) sarı, (-) mavi renk değeri

Hue: renk özü

g: gram

mg: miligram

kg: kilogram

L: litre

ml: mililitre

µl: mikrolitre

dk: dakika

s: saniye

mM: milimolar

rpm: dakika başına devir

mm: milimetre

mmol: milimol

°C: Santigrat derece

Na: sodyum

Mg: magnezyum

K: potasyum

Ca: kalsiyum

Mn: mangan

Fe: demir

Ni: nikel

Cu: bakır

Zn: çinko

Cd: kadmiyum

Nm: nanometre

Kısaltmalar

FAO: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

FDA: Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi

GRAS: genel olarak güvenilir kabul edilen

FAO STAT: gıda ve tarım örgütü

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

TEPGE: Tarımsal ekonomi ve politika geliştirme enstitüsü müdürlüğü

TÜP: Tarım ürünleri piyasası

TFM: Toplam fenolik madde

DPPH: 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikalinin inhibisyonu

ABTS: 2,2-azino-bis [3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit radikalinin inhibisyonu

FRAP: Ferrik iyonlarını indirgeme kuvveti

TPA: Tekstür profil analizi

GAE: Gallik asit eşdeğeri

TE: Troloks eşdeğeri

Std: standart sapma



1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea L.*) *Oleaceae* familyasına ait, ılıman bölgelerde yetişen bir meyve türüdür. Bu sebeple, daha çok Akdeniz'e kıyısı bulunan ülkelerde (İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Fransa ve Portekiz) yetiştiriciliği gerçekleştirilmektedir. 2021 yılında dünya genelinde 23 milyon ton zeytin üretimi gerçekleştirilmiştir (FAO, 2024; TEPGE,2024). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) 2021 verilerine göre İspanya dünya zeytin üretim miktarının %35'ini karşılamakta olup, bunu sırasıyla Yunanistan (%13), İtalya (%10), ve Türkiye (%7) takip etmektedir. FAO 2022 verilerine göre Türkiye, yıllık 2,976 milyon zeytin üretimi ile İspanya'dan sonra (3,940 milyon) dünyada en çok zeytin üreten 2. ülke konumuna gelmiştir (Yunanistan'ın 2022 yılına ait toplam zeytin üretim miktarı FAO veri tabanından erişilememiştir). TÜİK verilerine göre Türkiye'de dane zeytin üretim miktarı 2022 yılında 2.976.000 tondur. Dolayısıyla, zeytin ekonomik açıdan Türkiye için önemli bir zirai ürün konumundadır.

Dünya genelinde üretilen zeytin meyvesi sofralık zeytin ve yağlık zeytin olarak işlenebilmektedir. Dünyada üretilen zeytinin yaklaşık %10'luk kısmı sofralık zeytin olarak değerlendirilirken, geri kalan kısmının (%90) ise zeytinyağı üretiminde kullanıldığı düşünülmektedir (Gönenç; 2011). Türkiye'de ise 2022 yılında üretilen toplam 2.976.000 ton zeytinin, 938 bin tonunun (%31.5'inin) sofralık zeytin, 2.038 bin tonunun (%68.5'inin) ise yağlık zeytinden oluştuğu bildirilmiştir (TEPGE TÜP, 2024).

Zeytinyağı üretimi için fabrikaya gelen zeytinler yıkanıp, yaprak ve saplarından ayrıştırılır. Akabinde, temizlenen zeytinler presleme işlemine tabi tutulur. Presleme sonrasında oluşan zeytin posasına su eklenerek malakasyon, yani yoğurma işlemi gerçekleştirilir. Yoğrulup homojen hale gelen zeytin posası dekantasyona (yatay santrifüj) gönderilir. 2 fazlı üretimde dekantasyondan yalnızca pirina çıkarken, 3 fazlı üretimde pirina ve dekantasyon atık suyu açığa çıkar. Sulu zeytinyağı dikey santrifüj ile zeytinyağı ve su ayrılır. Soğuk sıkım olarak adlandırılan zeytinyağı 27 °C'nin altında işlenen zeytinyağıdır. Natürel zeytinyağı yalnızca fiziksel işlemlere tabi tutulan; riviera zeytinyağı ise fiziksel işlemlerin yanında bazı kimyasal işlemlere de (deoderizasyon- koku giderme, degumming

yapışkan maddelerin uzaklaştırılması gibi) tabii tutulmasıyla elde edilen yağ çeşididir. Soğuk sıkım zeytinyağı, üretim prosesinde düşük sıcaklıklar kullanılması nedeniyle zeytinin bileşimindeki yararlı bileşenleri (fenolikler gibi) yüksek oranda içermesi ve diğer zeytinyağı türlerine göre daha aromatik olması ile tanınmaktadır.

Zeytinyağı üretimi sırasında bazı atık ve artık ürünler oluşmaktadır. Bu atıkların katı kısmı pirina, sıvı kısmı ise karasu olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu bu atıklar, besinsel açıdan (fenolik bileşenler, antioksidan maddeler ve diyet lifleri açısından) zengin olmakla birlikte, içerdikleri organik maddelerden dolayı arındırılmadan çevreye bırakıldıklarında doğaya büyük zarar vermektedirler. İçermiş oldukları organik maddeler ekstrakte edilip, fonksiyonel özelliklerinden yararlanılarak gıdalara ikame edilmesi gibi değerlendirilme potansiyelleri bulunmaktadır. Dünya genelinde üretilen zeytinlerin büyük bir bölümü zeytinyağı üretiminde kullanıldığından dolayı, her yıl önemli miktarlarda pirina ve karasu açığa çıkmaktadır. Çevre sağlığı, sürdürülebilirlik, katma değer, yeni iş kollarının oluşması, istihdam sağlanması ve yeni fonksiyonel gıdalar üretimi için pirina ve karasudan faydalı bileşenlerin ekstraksiyonu önem kazanmıştır.

Pirina ve karasu fizyolojik öneme sahip fenolik bileşenler açısından oldukça zengin artık ve atık ürünlerdir. Fenolik bileşenler, kimyasal yapılarında en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla hidroksil grubu bulunduran bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Pereira ve ark., 2009).

Fenolik bileşenlerin fizyolojik etkilerinin bilimsel çalışmalarla belirlenmesiyle birlikte, tüketici ve üreticilerin fenolik bileşenlere olan ilgisi her geçen gün artmaktadır. Örneğin fenolik bileşenler antimikrobiyal, antioksidan, anti-kanserojenik özelliklerinden dolayı sağlık açısından büyük öneme sahiptirler. Fenolik bileşenler lezzet gelişimine etki ettiklerinden ürünün duyuşsal karakterizasyonunun oluşmasında ve stabiliteyi artırarak oto-oksidasyona karşı besinsel kalitenin korunmasında rol oynarlar (Bianco ve Uccella, 2000; Savarese ve ark., 2007; Uylaşer ve Yıldız, 2014). Bu etkilerinden dolayı fenolik bileşenlerin gıda endüstrisinde gıda ürünleri üretiminde doğal zenginleştirici ajan olarak kullanımı amacıyla büyük ilgi görmekte ve bu ilgi giderek artmaktadır.

Bu çalışmada, zeytinyağı endüstrisi artık ve atık ürünü olan pirina ve karasudan fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesi, bileşimlerinin ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve akabinde gıda endüstrisinde fonksiyonel ürün üretiminde ingrediyen olarak kullanılabilirliklerinin ekmeek model ürünü üzerinde belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Zeytin

Zeytin (*Olea europaea* L.) yağ, antioksidatif fenolikler, mineraller ve diyet lifleri açısından zengin (Çizelge 1), çoğunlukla Akdeniz iklim koşullarına sahip ülkelerde yetişen, bir meyve çeşididir. Yapılan analitik ve klinik çalışmalar zeytin bileşenlerinin insan sağlığı üzerine olumlu etki gösterebileceğini ortaya koymuştur (Guo ve ark., 2018). Örneğin, bünyesinde yüksek miktarda doymamış yağ asitlerini (oleik ve linoleik asitler) ihtiva etmesinden dolayı, zeytin (ve zeytinyağı) tüketiminin kolesterolü dengelediği, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (Ghanbari ve ark., 2012). Aynı şekilde, yüksek miktarda içermiş olduğu antioksidatif karakterdeki fenolik bileşenlerin, metabolizma sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin inaktivasyonunu sağlayarak, kansere ve strese dayalı hastalıklara karşı koruyucu etkiler göstermektedir (Ghanbari ve ark., 2012; Uylaşer ve Yıldız, 2014). İlâveten, içeriğinde bulunan yüksek miktardaki vitamin (A ve E vitaminleri) ve mineral maddeler (kalsiyum ve demir) bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesine katkı sağlamaktadır (Ghanbari ve ark., 2012).

Çizelge 1. Zeytinin (*Olea europaea* L.) besinsel kompozisyonu (Tanılğan ve ark., 2007; Uslu ve Özcan, 2020).

Besin	Miktar (%)*
Nem	35.3-59.2
Ham protein	0.8-2.0
Ham yağ	17.7-36.0
Doymamış yağ**	81.0-87.5
Doymuş yağ***	12.5-19.0
Ham lif	3.6-7.0
Kül	0.6-1.2
Toplam fenolik	2000-8500****

*Ülkemizde yetişen *Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye ve Ayvalık* zeytin çeşitlerinin içermiş oldukları en düşük ve en yüksek değeri ifade etmektedir.

**Oleik, linoleik ve linoleik asitlerin toplamını ifade etmektedir.

***Palmitik ve stearik asitlerin toplamını ifade etmektedir.

****mg GAE/kg

Zeytin meyvesinin kimyasal bileşenlerinin oranlarını meyvenin çeşidi, yetiştiği ortam, yetiştirme yöntemleri, coğrafi köken ve olgunluk düzeyi etkilemektedir. Zeytin meyvesinde bulunan fenolik bileşenler, meyve kabuğunun kahverengileşmesinde, duyuşsal ve aromatik özelliklerinde etkili olmakla birlikte, bitkinin farklı kısımlarına antimikrobiyal etki de göstermektedirler (Ghanbari ve ark., 2012, Boskou 1996).

Zeytin meyvesinin şekli oval sert çekirdekli, yaklaşık 2-3 cm boyutunda bir meyvedir. Zeytin meyvesi kabuk (epikarp), pulp (mezokarp) ve taş (endokarp) olarak 3 bölümden oluşur. Epikarp kısmı yani kabuk, olgunlaşma sırasında açık yeşil renkten sırasıyla mora kahverengiye ve siyah rengine döner (Ghanbari ve ark., 2012). Zeytin meyvesinin olgunlaşması normal iklim koşullarında 5 ay kadardır, soğuk iklim büyümeyi ve olgunlaşmayı olumsuz yönde etkilemektedir (Ghanbari ve ark., 2012, Boskou 1996).

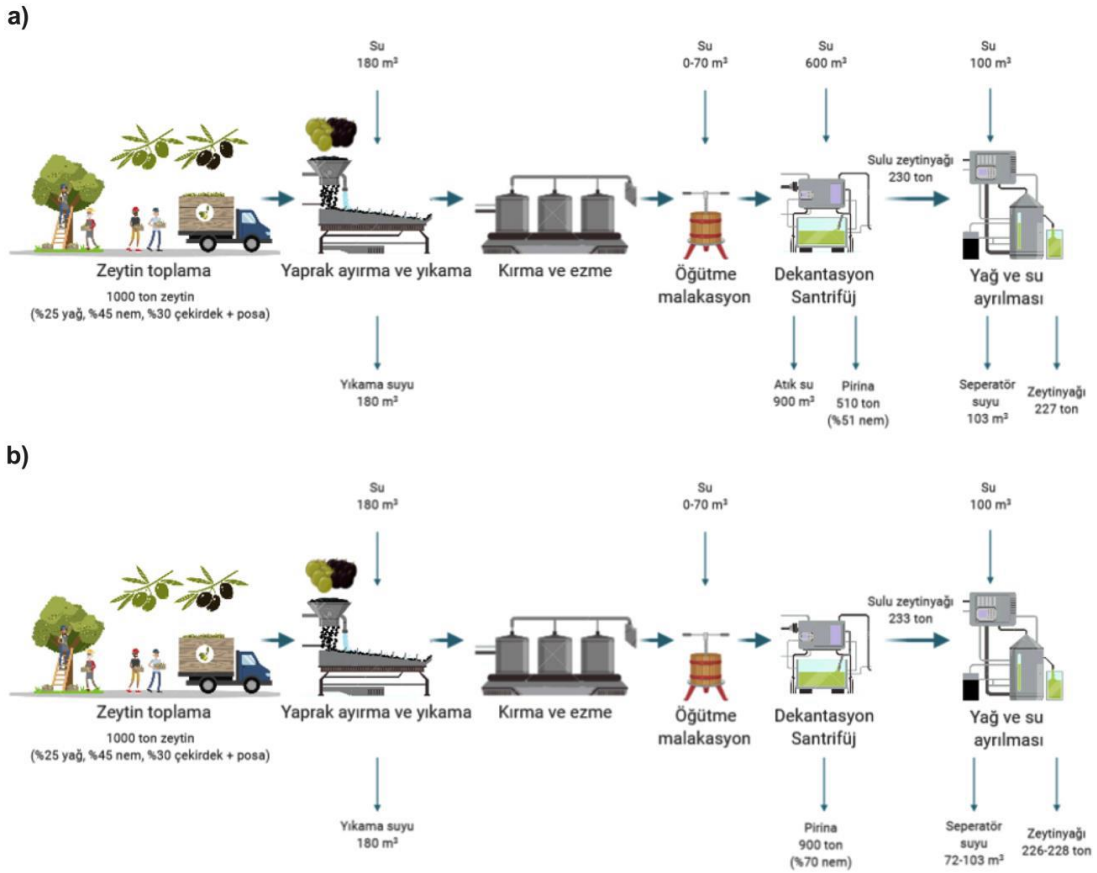
Besinsel değeri yanında, zeytin ekonomik açıdan oldukça önemli olan bir tarımsal üründür. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) verilerine göre, 2021 yılında dünya genelinde 23.499.054 ton zeytin danesi hasat edilmiş olup, bu hasadın %35'i İspanya, %13'ü Yunanistan %10'u İtalya ve %7'si Türkiye tarafından gerçekleştirilmiştir (FAOSTAT, 2024). Dünya genelinde, üretilen zeytinin %10'u sofralık ve geri kalan %90'lık kısmı ise zeytinyağı üretimi için değerlendirilmektedir (Gönenç, 2011).

Dünya genelinde üretilen zeytin meyvesi sofralık zeytin ve yağlık zeytin olarak işlenebilmektedir. Dünyada üretilen zeytinin yaklaşık %10'luk kısmı sofralık zeytin olarak değerlendirilirken, geri kalan kısmının (%90) ise zeytinyağı üretiminde kullanıldığı düşünülmektedir (Gönenç; 2011). Türkiye'de ise 2022 yılında üretilen toplam 2.976.000 ton zeytinin, 938 bin tonunun (%31.5'inin) sofralık zeytin, 2.038 bin tonunun (%68.5'inin) ise yağlık zeytinden oluştuğu bildirilmiştir (TEPGE TÜP, 2024).

2.2. Zeytinyağı

Zeytinyağı genellikle zeytin danesinin preslenmesi sonucu elde edilmektedir. Zeytinyağı üretiminde kullanılan yöntemler yağ ayırma sistemlerindeki farklılığa göre

ikiye ayrılmaktadır; **1)** kesikli üretim, **2)** sürekli üretim. Kesikli yöntem, yağın hidrolik presler yardımıyla çıkarılması esasına dayanmakta olup, geleneksel presleme yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Sürekli üretim sistemleri ise daha modern bir yöntem olup, yağın santrifüj kuvveti yardımıyla çıkartılması esasına dayanmaktadır. Ülkemizde ve dünyada ticari zeytinyağı işletmelerinde genel olarak sürekli üretim sistemleri kullanılmaktadır. Sürekli sistemler ile zeytinyağı üretimi genel olarak beş aşamadan oluşmakta olup, bunlar **1)** zeytinin temizlenmesi (yaprak ayırma, yıkama), **2)** kırma-ezme, **3)** malaksasyon (yoğurma ve öğütme), **4)** dekantasyon (santrifüj kuvveti ile katı ve sıvı kısmın ayrılması), **5)** seperasyon (su ve diğer kalıntıların santrifüj kuvveti ile ayrılması). Sürekli üretim sistemleri, üretim esnasında dekantöre su ilave edilip edilmemesine göre iki fazlı ve üç fazlı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2). Su tasarrufunun daha fazla olmasından ve elde edilen zeytinyağının daha dayanıklı olmasından (daha fazla antioksidan bileşen içerdiğinden dolayı daha stabil zeytinyağı elde edilmesinden) dolayı, günümüzde iki fazlı üretim sistemleri daha yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Baysan ve ark. 2023).



Şekil 1.a) Üç fazlı zeytinyağı üretim prosesi, **b)** iki fazlı zeytinyağı üretim prosesi (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı internet sitesinde verilen bilgiler doğrultusunda yeniden çizilmiştir- <https://zeytinay.csb.gov.tr>).

Şekil 1’de görüldüğü üzere, zeytinyağı üretimi esnasında katı ve sıvı atıklar/artıklar ortaya çıkmaktadır. Katı artık, dekantörden elde edilen çekirdek, kabuk ve posadan oluşan ve pirina olarak adlandırılan kısımdır. Pirina değişik amaçlarla (gübre, yakıt ve hayvan yemi olarak) kullanıldığından dolayı, atık yerine artık olarak adlandırılmaktadır. Pirina, yüksek miktarda diyet lifi, protein ve fenolik bileşen içermektedir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Zeytinyağı üretiminde (iki fazlı üretim prosesi) açığa çıkan pirinanın kompozisyonu (Souilem ve ark., 2017).

Besin	Miktar (%)
Nem	56.80±2.2
Yağ	4.50±1.7
Protein	2.87±0.0
Diyet lifi	
<i>Selüloz</i>	14.54±0.2
<i>Hemiselüloz</i>	6.63±0.4
<i>Lignin</i>	8.54±0.2
Toplam şeker	0.83±0.0
Fenolik bileşen	2.43±0.2

Sıvı atıklar ise karasu (dekantörden ve seperatörden elde edilen sıvı) ve yıkama suyu olarak iki gruba ayrılmaktadır. Karasu, bünyesinde organik bileşenleri (polifenolik bileşenler, şekerler, mineraller) yüksek oranda ihtiva ettiğinden dolayı (Çizelge 3), çok yüksek organik kirlilik yüküne sahiptir (karasuyun biyolojik oksijen ihtiyacı ve kimyasal oksijen ihtiyacı değerlerinin sırasıyla 89-100 g/L ve 80-200 g/L aralığında olduğu bildirilmiştir) (Tunç ve Ünlü, 2015).

Çizelge 3. Zeytinyağı üretiminde açığa çıkan karasuyun kompozisyonu (Souilem ve ark., 2017).

Besin	Miktar (aralık, g/L)
Toplam kuru madde	11.5-90
Yağ	7
Fenolik bileşen	0.8-8.9
Toplam şeker	1.3-4.3
Toplam nitrojen	0.06-0.9

Son yıllarda, gerek ekonomik nedenlerden dolayı (işletmelerin zeytinyağı üretim prosesinden katma değeri yüksek ürünler elde etme arzusu) gerekse çevresel etkilerden

dolayı (özellikle karasuyun çevreye verdiği/vereceği zararı azaltmak maksadıyla), zeytinyağı endüstrisinde meydana gelen atık ve artık maddelerin yeniden işlenmesi ve ekonomiye kazandırılması konusu önem arz etmeye başlamıştır. Bu maksatla, zeytinyağı üretimi sırasında açığa çıkan pirina ve karasu içerisinde bulunan bileşenlerin, özellikle fenolik bileşenlerin ve diyet liflerinin, ekstrakte edilip, gıda, kozmetik ve eczacılık alanlarına kazandırılmasıyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Örneğin, hem karasudan hem de pirinadan antioksidan kapasitesi yüksek olan fenolik bileşenlerin farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak ekstrakte edilebileceği (Tornberg ve ark., 2010; Frankel ve ark., 2013; Kalogerakis ve ark., 2013; Leouifoudi ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017; Veneziani ve ark., 2017; Caporaso ve ark., 2018; Galanakis ve ark., 2018) ve bu ekstraktların da ekstra sızma zeytinyağının oksidatif stabilitesini artırmak maksadıyla (Frankel ve ark., 2013; Galanakis ve ark., 2018), sütlü içeceklerde besinsel değeri artırmak için (Veneziani ve ark., 2017) ve süt, fırın ve et ürünleri endüstrilerinde antimikrobiyal gıda bileşeni olarak (Veneziani ve ark., 2017) kullanılabilecekleri gösterilmiştir. Ayrıca zeytinyağı endüstrisi atıklarından elde edilmiş olan biyoaktif bileşenlerin (özellikle fenoliklerin) kozmetik endüstrisinde değerlendirilme potansiyelleri olduğu da ortaya konulmuştur (Rodrigues ve ark., 2017).

2.3. Fenolik Bileşenler, Fonksiyonel Özellikleri ve Zeytin Fenolikleri

Fenolik bileşenler veya polifenoller kimyasal yapı olarak en az bir aromatik halka (benzen) ve bu halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu bulunduran bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Fenolik asitler (hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asit) ve flavonoidler (antosiyanidin, proantosiyanidin, flavon, flavonon, flavonol, izoflavonoid) olmak üzere iki grupta sınıflandırılan fenolik bileşenlerin en önemli doğal kaynakları meyve ve sebzelerdir. Meyve ve sebzelerin çeşitli kısımlarında bulunan fenolik bileşenler, bitkileri haşere ve mikroorganizmalara karşı koruyan metabolitler olup, aynı zamanda bitkilere kendilerine özgü lezzet ve renkleri de vermektedirler. Fenolik yapıdaki bileşenler, serbest radikalleri inaktif hale geçirmekte ve lipid peroksidasyonuna neden olan metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan etki göstermektedirler (Pereira ve ark.,2009). Bu etkileri nedeniyle, fenolik ve antioksidanlara yer verilen beslenme programlarının uygulandığı durumlarda kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli sağlık sorunları üzerine olumlu etki

yaptığı tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2009; Zhong ve ark., 2012; Khan ve Mukhtar, 2010; Marques ve ark., 2009).

Zeytin, 2000 - 8500 mg GAE/kg oranında fenolik bileşen içermektedir (Uslu ve Özcan,2020). Zeytinyağı üretimi esnasında, zeytin fenoliklerinin büyük bir kısmı (%98) pirina ve karasuda kalmakta olup, yalnızca küçük bir kısmı (%2) zeytinyağına geçmektedir (Morillo ve ark., 2009). Yüksek fenolik bileşen içeriğine sahip olduklarından dolayı, pirina ve karasudan fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesi ve sonrasında gıda formülasyonlarında değişik amaçlar doğrultusunda kullanılmasına olan ilgi artmaktadır. Nitekim, Amerika Birleşik Devletleri'nde zeytin pulpu ekstraktının, antioksidan olarak fırıncılık ürünlerinde, içeceklerde, soslarda, atıştırmalık ürünlerde ve fonksiyonel gıdalarda son ürünlerdeki konsantrasyonu 3000 mg/kg'ı aşmayacak şekilde kullanımına FDA tarafından GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilen) statüsü (GRN No. 459) ile izin verilmiştir (FDA, 2014; Galanakis ve ark., 2015).

Karasuda bulunan fenolikler yapılarına göre üç sınıfa ayrılmaktadır: **1)** tirozol yapısında olanlar (tirozol, hidroksitirozol, p-hidroksifenilasetik), **2)** benzoik asit türevleri (p-hidroksi benzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, veratrik asit, gallik asit, sirinjik asit) ve **3)** sinamik asit türevleri (p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit) (Torrecilla, 2010).

Benzer şekilde, pirina da biyoaktif özelliklere sahip maddeler, özellikle fenolik bileşenler, açısından zengin bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Frankel ve ark., 2013). Tirozol, hidroksitirozol, oleuropein, kafeik asit, p-kumarik asit, vanilik asit, verbaskozit, elenolik asit, kateşol ve rutin zeytin posasında bulunan önemli fenolik bileşenler arasında sayılabilmektedir. Alu'datt ve ark. (2010)'a ait çalışmada, zeytin posasında bulunan fenolik bileşenlerin çoğunlukla (%75-90) serbest formda oldukları belirlenmiştir. Pirinadaki fenolik bileşenlerden protokateşik asit, hidroksibenzoik asit, sinapik asit, p-kumarik asit, rutin ve hesperidin serbest; sirinjik asit, sinapik asit, kafeik asit ve protokateşik asidin ise bağlı formda oldukları bildirilmiştir. Yağlı pirinada bulunan temel fenolik bileşenler sirinjik asit (%22), protokateşik asit (%21), kafeik asit (%14), sinapik asit (%13), ve rutin (%12) olup, yağı alınmış pirinada ise bu fenolik bileşenlerin oranı sırasıyla 23%, 14%, 11%, 17% ve 8% olarak tespit edilmiştir (Frankel ve ark., 2013). Bu değerli bileşenleri (fenolik bileşenleri) bulunduran atık ürünlerin geri kazanımı ve çeşitli uygulamalarda, özellikle gıda üretiminde, kullanımı oldukça ilgi

gören ve üzerinde büyük yatırımlar yapılan bir konu olup, halihazırda devam eden “sıfır atık” projesi kapsamında da önemli bir yere sahiptir (www.sifiratik.gov.tr). Örneğin, Galanakis ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada zeytinyağı atıklarının askorbik asite kıyasla 10 kat; tokoferol karışımı ve α -tokoferole kıyasla ise 20 kat daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle zeytinyağı atıkları olan karasu ve pirinadaki fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu ve gıda uygulamalarında antioksidan ve antimikrobiyal amaçlı kullanımı hem atıkların değerlendirilmesi hem de fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Zeytinyağında bulunan fenolik bileşenler, yukarıda da bahsedilen sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle, birçok gıda uygulamasında biyoaktif bileşen olarak kullanılmakta olup, daha yaygın ve etkin kullanımına yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Fenolik bileşenlerin biyoaktivitelerini en iyi temsil eden özelliklerden biri olan antioksidan aktiviteleri nedeniyle, sağlığa zararlı potansiyel etkilerinden dolayı kullanımları sınırlandırılan sentetik antioksidanlara alternatif olarak, çeşitli bitkisel ve hayvansal yağların muhafazasında kullanılmış ve yağların oksidasyona karşı dirençlerinin arttığı belirlenmiştir (Fki ve ark., 2005; De Leonardis ve ark., 2007; Abd-ElGhany ve ark., 2010; Sanchez de Medina ve ark., 2011; Esposto ve ark., 2015). Makarna ürünlerinde ise nispeten daha dayanıklı bir ürün olması nedeniyle daha çok besin değeri açısından zenginleştirme maksadıyla zeytinyağı artıklarından yararlanılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda zenginleştirme yapılan makarnaların fenolik madde miktarlarında ve antioksidan kapasitelerinde belirgin artışlar gözlenirken, duyuusal anlamda bazı olumsuzluklara rastlandığı belirtilmiştir (Simonato ve ark., 2019; Cedola ve ark., 2020). Benzer şekilde, ekme ve bisküviye fonksiyonellik katmak ve bu ürünleri zenginleştirmek amacıyla pirinadan ekstrakte edilen fenoliklerin formülasyona ilavesiyle olumlu sonuçlar alınmıştır (Cedola ve ark. 2019; Conterno ve ark., 2019). Cecchi ve ark. (2019)’a ait bir çalışmada ise yine pirina ile zenginleştirilen ekmeğin günlük 18 g tüketildiğinde, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından sağlık için yeterli olduğu düşünülen 5 mg hidroksitirozol ve türevlerinin alımı için, yeterli olduğu belirlenmiştir. Galanakis ve ark. (2015)’e ait çalışmada zeytinyağı atıklarından elde edilen fenollerin antimikrobiyal etkileri sayesinde ekmeğin raf ömrünün 10 günden 15 güne çıkarıldığı bildirilmiştir. Zeytinyağı artıklarından elde edilen fenolik bileşenlerin gıdalarda bozulma nedeni olarak sıklıkla

karşılaşılan *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* (Tafesh ve ark., 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Roila ve ark., 2016), *Listeria monocytogenes* (Galanakis, 2016) gibi bakteriler ile *Botrytis cinerea* (Yangui ve ark., 2010), *Penicillium* ve *Aspergillus* (Chaves-Lopez ve ark., 2015) gibi küflere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çeşitli et ürünlerinde (Balzan ve ark., 2017; Galanakis, 2016 Chaves-Lopez ve ark., 2015; Fasolato ve ark., 2015) ve balıkta (Fernandez-Bolanos ve ark., 2006; Cedola ve ark., 2017), antioksidan, antimikrobiyal ve renk özelliklerinin korunması amacıyla, zeytinyağı artıklarının kullanımına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Antimikrobiyal etkileri nedeniyle, pirina ve karasudan elde edilen fenolik ekstraktlar fermente süt ürünlerinde kullanıldığında ise yararlı bakterilerin canlılığı ve fermentasyona ilişkin herhangi bir olumsuzluğa neden olmadığı, bunun yanında fenolik madde miktarında artış sağladığı görülmüştür (Servili ve ark., 2011; Aliakbarian ve ark., 2015). Ayrıca, UHT işlemi öncesi süte ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki karasu fenoliklerinin reaktif karbonillerinin kontrolünü sağlayarak Maillard reaksiyonunu azalttığı belirlenmiştir (Troise ve ark., 2014).

Antimikrobiyal ve antioksidatif etkilerine ilaveten, fenolik bileşenler nişasta (özellikle nişastanın amiloz kısmı) ile hidrofobik etkileşimler kurarak ve/veya amilaz enzimini kısmen inaktive ederek nişasta sindirim hızını yavaşlatmakta ve dirençli nişasta miktarının artmasını sağlayarak, nişastanın glisemik indeks değerini azaltabilmektedir (Amoako ve Awika, 2019; Li ve ark., 2018; Girard ve Awika, 2018; Amoako ve Awika, 2016; Zhu, 2015; Barros ve ark., 2012). Bilindiği üzere çağımızın en büyük hastalıklarından biri obezitedir. Obezite oluşumuna neden olan en önemli faktör, diyetle yüksek miktarda yağ ve sindirilebilen karbonhidrat (yüksek glisemik indekse sahip şekerler, özellikle nişasta ve sükröz) bulunmasıdır. Bu sebepten dolayı, sağlıklı tüketim konusunda tüketicilerin de bilinçlenmesine paralel olarak, sindirilebilir karbonhidrat içeriği az olan, düşük glisemik indekse sahip ürünlere karşı olan ilgi hızla artmaktadır. Gıda ürünlerinin (özellikle fırıncılık ürünlerinin) glisemik indeksini azaltmak için fenolik bileşenler ürün formülasyonuna dahil edilmektedir (Dunn ve ark., 2015). Bu maksatla, ürün formülasyonuna dahil edilen fenolik bileşenler genellikle çay yaprağı, tahıl (özellikle sorgum) kepekleri ve nar kabuğu gibi bitkisel ürünler endüstrisinin atık ve artıklarından ekstrakte edilmektedirler (Zhu, 2015). Yukarıda da belirtildiği üzere, zeytinyağı endüstrisi atık ve artık ürünleri olan karasu ve pirina yüksek fenolik bileşen içeriğe sahiptirler (Çizelge 2 ve Çizelge 3).

2.4.Ekmek

Tahıl ürünleri insan beslenmesinin çok önemli bir bileşeni olup, enerji, kompleks karbonhidratlar, B grubu vitaminleri, protein, mineraller ve diyet lifi kaynağıdır. Ekmek tahıl ürünleri arasında duyuşal ve yapısal özellikleri nedeniyle günlük beslenmede en çok tüketilen tahıl ürünüdür (Mastromatteo ve ark., 2014). Küresel olarak buğday, glütensiz ve kompozit (farklı unların karışımından elde edilir) unlardan üretilen ekmek olmak üzere üç tür ekmek üretilmektedir. Bunlar arasında en çok tercih edilen ekmek çeşidi buğday ekmeğidir. Buğday, ekmek üretiminde kullanılmadan önce öğütme işlemine maruz bırakılarak un elde edilir. Ekmek formülasyonlarında genel olarak kullanılan un rafine buğday unudur. Rafine buğday unu üretimi sırasında buğday tanesinin besinsel bileşenler açısından en zengin kısımları olan kepek ve ruşeym katmanları uzaklaştırılmaktadır. Bu besinsel anlamda zengin kısımların uzaklaştırılması unun raf ömrünü ve ekmek yapım kalitesini geliştirirken, bu katmanların protein, lif, vitamin, mineral ve biyoaktif bileşenler (fenolik bileşikler) bakımından endosperm (unsu öz) kısmından daha zengin olması nedeniyle unun besin değeri düşmektedir.

Günümüzde birçok çalışma rafine gıdaların uzun sürekl tüketiminin kronik hastalık riskinin artmasıyla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir ve günümüz toplumunun gıdalara bakış açısının değışmesine neden olmuştur. Toplumların bu bakış açısı özellikle küresel boyutta gerçekleşen salgınlar ve artan sağlık problemleri ile hızla yayılmış ve tüketicileri de sağlıklı ürün arayışına ya da var olan ürünlerin besinsel özelliklerinin zenginleştirmeye yönlendirmiştir. Bu nedenle birçok gıda ürününün doğal bileşenlerin eklenmesi yoluyla besin değerini zenginleştirerek tüketici açısından çekiciliğini artıracak çözümler aranmaya başlanmıştır. Yaygın tüketimi nedeniyle, 37 gelişmiş toplumda toplam enerji alımının %50'sinden fazlasını sağlayan ekmek, işlevsel takviyeler için en iyi araç olarak kabul edilir (Akhtar ve ark., 2011). Bugüne kadar, ekmeğin besin özelliklerini iyileştirmek için çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Bunlar arasında en yaygın olanları antioksidan içeriğini artırmak ve nişasta sindirimini düzenlemek için ham sebze veya meyve tozları, fenolik bileşikler ve diyet lifi açısından zengin yan ürünlerin kullanıldığı çalışmalardır (Bianchi ve ark., 2021; Tolve ve ark., 2021). Ekmeğin antioksidanlar ve diyet lifleri açısından zenginleştirilmesi ve karbonhidrat alımının azaltılması sağlanmış olsa da, bazen duyuşal kabul edilebilirliğin

azalması, daha düşük hacim, daha düşük raf ömrü ve güçlendirilmiş ekmeğin daha yüksek sertliği gibi birkaç sorun ortaya çıkmıştır (Tolve ve ark., 2021). Bununla birlikte bu alanda birçok başarılı araştırma yapılmaya devam etmektedir ve en çok da bitkisel kaynaklar ve bitkisel atıklar dikkat çekmektedir. Bunun temelindeki faktör, bitkisel kaynaklarda bulunan fenolik bileşiklerin birçok alandan araştırmacının dikkati çekmesidir. Fenolik bileşikler açısından zengin diyetlerin kan basıncını düşürdüğü ve kan lipid profilini iyileştirdiği, pankreas β -hücrelerinin korunmasıyla insülin direncini önlediği, kan glikozunu ve taşınmasını düşürerek glisemik yanıtı kontrol ettiği bildirilmiştir (Curtis ve ark., 2019; Martínez-López ve ark., 2019). Şu anda, zenginleştirme yoluyla ekmeğin işlevsel özelliklerinin iyileştirilmesiyle ilgili birkaç başarılı çalışma bulunmaktadır. Gawlik-Dziki ve ark. (2013) %0-5 oranında soğan kabuğu tozu ile ekmeği zenginleştirdikleri çalışmalarında; kontrole kıyasla ekmek örneklerinin antioksidan ve fenolik içeriğinin önemli oranda artış gösterdiğini, duyuşal açıdan en beğenilen ekmeklerin %3 soğan kabuğu tozu ilaveli örnekler olduğunu bildirmişlerdir. Goh ve ark. (2015) yeşil çay ekstraktının ekmeğin in vitro sindiriminin ilk 90 dakikasında glikoz salınımını azaltarak glisemik potansiyelini azalttığını rapor etmişlerdir. Lin ve Zhou (2018) kuersetin ilavesinin ekmek örneklerinin antioksidan aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini aynı zamanda ekmek hacmini düşürerek sertliği artığı belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

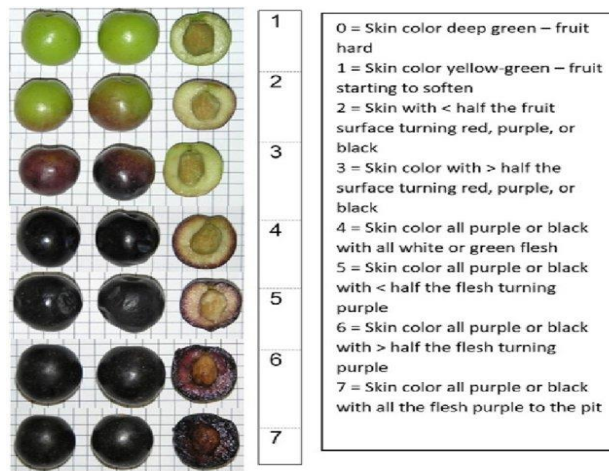
3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılan, zeytinyağı üretimi atık ve artık ürünlerinden pirina ve karasu, Manisa-Akhisar'da bulunan Aydar Zeytincilik ve Tarım Ürünleri Sanayi ve Ticaret Limitet Şirketi'nden temin edilmiştir. Ekmek üretimde kullanılan buğday unu (Hekimoğlu, Konya, Türkiye; Konya Yıldızı Konya, Türkiye), yaş maya (Pakmaya, Kocaeli, Türkiye) ve tuz (Salina, Konya, Türkiye) Konya ilinde faaliyet gösteren firma ve yerel marketlerden temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Karasu ve pirina örneklerinin ayrılması ve muhafazası

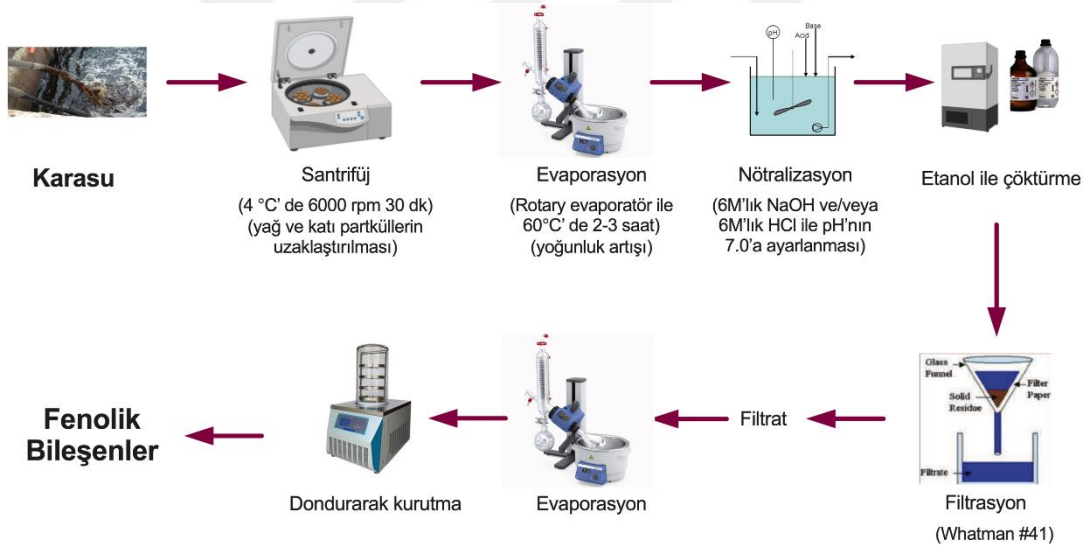
Karasu ve pirina örneklerinde standardizasyon sağlanması amacıyla, 2 fazlı çalışma sistemi olan zeytinyağı işletmesinden, Aralık- Ocak aylarında hasat edilmiş, yağ verimi yüksek (%22-25), Manisa-Akhisar bölgesindeki Gemlik çeşidi zeytinlerden zeytinyağı eldesinde (Malaksör sıcaklığı 25 °C ve malaksasyon süresi 35 dakika) açığa çıkan sulu pirina örnekleri fabrikadan alınıp, laboratuvar ortamında santrifüj işlemine (9000 rpm 20 dk) tabi tutulmuş, karasu ve pirina ayrı ayrı elde edilmiştir (üretimde dahil edilen zeytinlerin olgunluk seviyelerinin 6-7 arasında olduğu bildirilmiştir (Şekil 2). Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen pirina ve karasu herhangi bir bozulma olayı (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik) yaşanmaması adına ekstraksiyon işlemine kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. Zeytin olgunluk indeksi

3.2.2. Karasudan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu (etanolik ekstrakt)

Karasuda bulunan fenolik bileşenler, Şekil 3'te akış şeması verilen yöntem dahilinde ekstrakte edilmiştir. Özetle, karasuda bulunması muhtemel yağ ve katı partiküller, 4 °C de 6000 rpm de 30 dk santrifüj işlemi uygulanarak uzaklaştırılmıştır. Süpernetant, rotary evaporatör kullanılarak 40 °C de 4-6 saat boyunca evapore edilerek, örnek yoğunluğu artırılmıştır. Evapore edilen karasu örnekleri, NaOH veya HCl çözeltisi (6M) kullanılarak nötralize edilmiş ve hacminin 3 katı oranında soğuk etanol (-20 °C de depolanmış) ilave edildikten sonra +4 °C'de 12 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda filtrasyon uygulanarak (Whatman 41) pellet ve süpernetant kısımları ayrılmıştır. Filtrasyon sonunda elde edilen pelet, karasuda bulunan diyet liflerini, süpernetant ise karasuda bulunan fenolik ekstraktı oluşturmaktadır. Filtrasyon sonucu elde edilmiş olan sulu kısmın içermiş olduğu etanol rotary evaporatör yardımıyla (40 °C de) ortandan uzaklaştırılmış ve geri kalan su ise dondurarak kurutma yöntemiyle uzaklaştırılarak, toz formda fenolik bileşen ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt, analizler gerçekleşinceye kadar -20 °C de depolanmıştır.



Şekil 3. Karasudan fenolik bileşenlerin ekstraksiyon prosesi

3.2.3. Pirinadan fenolik bileşenlerin eldesi

Pirinadan fenolik bileşenlerin eldesi maksadıyla ilk etapta 22 farklı ekstraksiyon yöntemi denenmiş (ön deneme) ve fenolik bileşen verimi hesaplanmıştır (kullanılan farklı yöntemlerin ve elde edilen sonuçların detayları EK-1 olarak sunulmuştur). Ön denemeler sonucunda, en yüksek verimin elde edildiği yöntem (Şekil 4) pirinadan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Şekilde özetlendiği gibi, pirina örnekleri ilk etapta %80'lik etanol ile (1 g kuru pirina örneği için 10 mL çözelti) 6 saat

boyunca 40 °C'de çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Daha sonra 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, sulu kısmın içerdiği etanol rotary evaporatör yardımıyla (40 °C de) uzaklaştırılmış ve geri kalan su ise dondurarak kurutma yöntemiyle uzaklaştırılarak fenolik bileşenler ekstrakte edilmiştir.



Şekil 4. Pirinadan fenolik bileşenlerin ekstraksiyon prosesi

3.3. Ekstraktta Yapılan Analizler

3.3.1. Protein analizi

Elde edilen etanolik ekstraktların protein içerikleri, Dumas metoduna dayalı LECO azot tayin cihazı (LECO #FP828) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizde helyum, oksijen ve kuru hava gazları kullanılmakta olup, helyum yürütücü-inert gaz; oksijen ve kuru hava gazları ise yakıcı gaz olarak kullanılmaktadır. Bu maksatla, Dumas numune kaplarına 0,100 g örnek tartılmıştır. 850-950°C'lere ulaşan fırın sıcaklığına sahip cihazda (Şekil 5) örnekler, oksijen ve kuru hava gazlarının yardımıyla yakılmış ve içerisinde bulunan azot miktarı hesaplanmıştır. Akabinde 5.30 faktörü kullanarak % protein değeri hesaplanmıştır. Analiz her bir örnek için en az 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. Leco Protein cihazı

3.3.2. Kül analizi

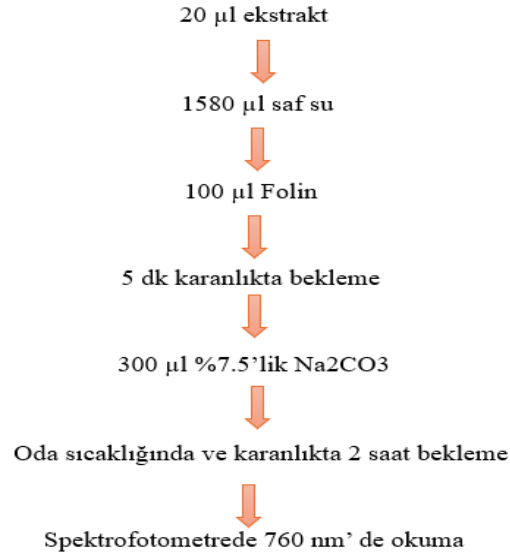
Örneklerin kül içeriklerinin belirlenmesi, AOAC Official Methods 923.03'e göre, kül fırınında koyu renk kalmayana dek yakılması sonucunda ağırlık kaybının % kuru madde üzerinden hesap edilmesi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, her bir örnek için en az 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6. Kül Fırını

3.3.3. Toplam fenolik madde analizi

Toplam fenolik madde tayini, Singleton (1999)'un belirlediği ve Folin-Ciocalteu reaktifinin kullanıldığı yöntemde, Çelik ve Tuncil (2020) tarafından detayları verilmiş modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g örnek) olarak hesaplanmıştır. Kullanılan Folin-Ciocalteu metodunun detaylı akış şeması Şekil 7'de verilmiştir.



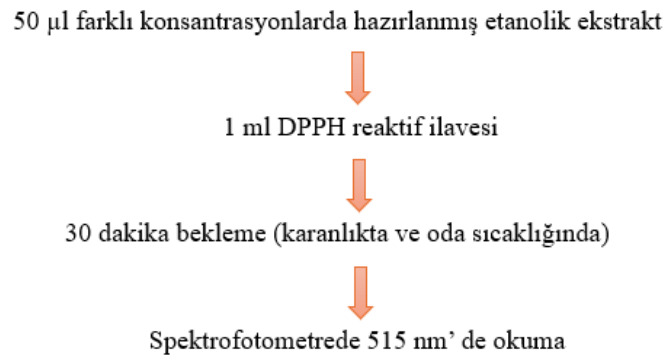
Şekil 7. Toplam fenolik madde analizi akış şeması

3.3.4. Antioksidan aktivite analizi

Pirina ve karasudan elde edilmiş olan etanolik ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri kullanılarak belirlenmiş olup, her bir metodun detayı aşağıda verilmiştir.

3.3.4.1. DPPH nalizi

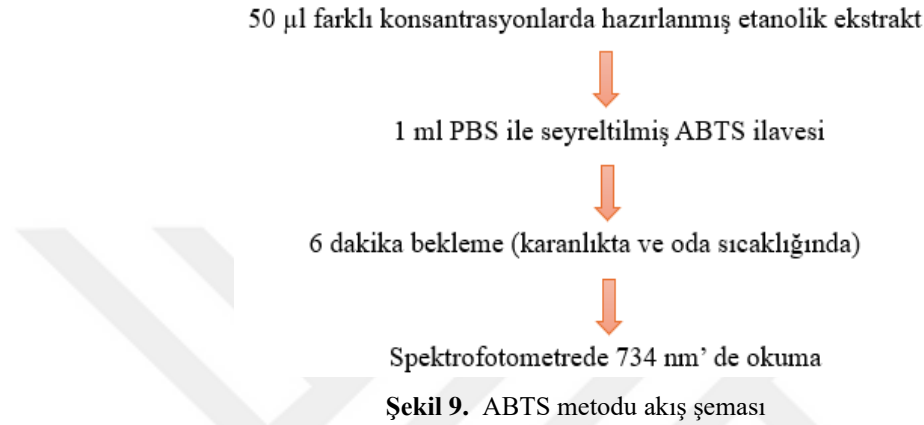
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ile antioksidan aktivite tayini Hasanaha ve Hilmaa (2016) tarafından detayları verilmiş olan spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiş olup, yöntemin akış şeması Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. DPPH metodu akış şeması

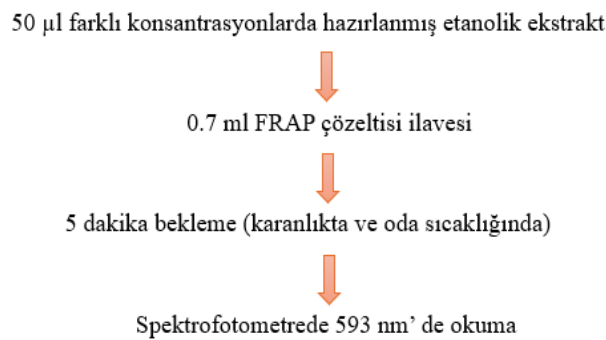
3.3.4.2. ABTS analizi

ABTS (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit]) yöntemi ile antioksidan aktivite tayini, Çelik ve Tuncil (2020) tarafından detayları verilmiş olan spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiş olup, yöntemin akış şeması Şekil 9'da verilmiştir.



3.3.4.3. FRAP analizi

FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi) ile antioksidan aktivite tayini Rajurkar ve Hande (2011) tarafından detayları verilmiş olan spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiş olup, yöntemin akış şeması Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. FRAP metodu akış şeması

3.3.5. Antimikrobiyal aktivite analizi

Pirina ve karasu fenoliklerinin antimikrobiyal aktivite tayini Çelik ve Tunçil (2020) tarafından detayları verilmiş olan Kirby Bauer yöntemi olarak da bilinen disk

difüzyon yöntemi ve kuyucuk yöntemiyle iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlara (50, 100, 200 ve 400 mg/mL) sahip pirina ve karasu fenoliklerinin sulu ekstraktları hazırlanmış ve kıyaslama amaçlı olarak funguslar için nystatin (NY-100 µg) ve amfoterisin B (AMB-100 µg); bakteriler için ise ampisilin (AM-10 µg) ve kloramfenikol (C-30 µg) (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) 6 mm çaplı antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

3.3.5.1. Kültürlerin hazırlanışı

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde gıda kaynaklı ve insan patojeni bakterilerden gram pozitif olarak *Staphylococcus aureus* NCTC 8530, *Bacillus subtilis* NRRL-B209 (BS), *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 (BZ), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (LM), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (EF), *Micrococcus luteus* NCIMB 8166 (ML) gram negatif olarak ise *Escherichia coli* ATCC 8739 (EC) ve *Pseudomonas aureginosa* ATCC 9027 (PA); mayalardan *Torulasporea delbrueckii* DSM 70504 (TD), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (SC), *Candida albicans* ATCC 10231 (CA); küflerden ise *Aspergillus niger* DSM 2466 (AN), *Penicillium brevicompactum* DSM 2215 (PB) model mikroorganizmalar olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak maya ve küfler, unlu mamullerden ekmekte sıklıkla karşılaşılan kontaminasyon kaynağı mikroorganizmalar arasından seçilmiştir (Elgün ve Ertugay, 2002; Garnier ve ark., 2017; Delavenne ve ark., 2013). Seçilen bakteriler (BS, BZ ve ML 30°C, diğerleri 37°C, 24-48 saat) ve funguslar (25°C, 24-72 saat) stoktan alındıktan sonra sırasıyla Triptik soy broth ve Saboraud dekstroz broth (AN ve PB için Saboraud dekstroz agar kullanılmıştır) içerisinde geliştirilmiş ve pasaj geçilen taze kültürleri antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılmıştır. Sıvı kültürler 3500 rpm hızda 5 dk santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmış ve hücre pelletleri steril serum fizyolojik (%0.85 NaCl) içerisinde süspanse edilerek spektrofotometrede absorbansları McFarland 0.5'e göre standardize edilmiştir ($OD_{600nm} = 0.1 \pm 0.01$). Agar üzerinde geliştirilen AN ve PB küflerinin sporları agar üzerinden steril bir öze ile kazınarak yine steril serum fizyolojik içerisine transfer edilmiş ve Thoma lamı ile spor sayımları gerçekleştirilerek 10^7 spor/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.5.2. Disk difüzyon antimikrobiyal aktivite tayini

90 mm çaplı steril petriler içerisinde 20 ml olarak analizden 2 gün önce hazırlanan agarlar (bakteriler için Mueller Hinton ve funguslar için Saboraud dekstrozu) üzerine standardize edilen süspansiyonlardan 100 µL transfer edilerek steril eküvyon çubukları ile yayılmıştır. Buzdolabında 30 dk bekletildikten sonra, her petriye toplamda 6 disk (ilgili 2 antibiyotik diski ve 4 farklı konsantrasyon için 4 boş disk) yerleştirildikten sonra boş disklere pirina/karasu sulu ekstraktlarından 10 µL emdirilmiştir. Ekim yapılan petriler, test mikroorganizmaları için uygun sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra (bakteriler için 18-24 saat, funguslar için 48 saat) kumpas yardımıyla inhibisyon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Her analiz iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.5.3. Kuyucuk yöntemleriyle antimikrobiyal aktivite tayini

90 mm çaplı steril petriler içerisinde 20 ml olarak analizden 2 gün önce hazırlanan agarlar (bakteriler için Mueller Hinton ve funguslar için Saboraud dekstrozu) üzerine standardize edilen süspansiyonlardan 100 µL transfer edilerek steril eküvyon çubukları ile yayılmıştır. Buzdolabında 30 dk bekletildikten sonra, ilgili 2 antibiyotik diski agar üzerine yerleştirilmiş ayrıca, ek olarak mantar delici yardımıyla 6 mm çapa sahip 4 kuyucuk açılarak bu kuyucuklara 40 µL pirina/karasu sulu ekstraktları transfer edilmiştir. Ekim yapılan petriler, test mikroorganizmaları için uygun sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra (bakteriler için 18-24 saat, funguslar için 48 saat) kumpas yardımıyla inhibisyon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Her analiz iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. HPLC ile basit şekerlerin belirlenmesi

10 mg etanolik ekstrakt 1 mL su içerisinde çözündürülmüş ve akabinde santrifüj işlemi (4000 rpm de 5 dk) uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonucunda süpernatant kısmı alınmış ve 0.45 µm por çapına sahip filtreden geçirilmiştir. Akabinde örnekler içerisinde bulunan glikoz, fruktoz ve sakkaroz miktarları CARBOsep CHO-682 kolon ve dırılma indisi (refractive index) detektörüne sahip HPLC cihazı (Shimadzu LC-2050C HPLC-RID) ile analiz edilmiştir. Mobil faz olarak H₂O kullanılmış olup kolon akış hızı ve sıcaklığı sırasıyla 1.0 mL/dk ve 80 °C olarak uygulanmıştır.

3.3.6. LC-MS/MS ile fenolik bileşenlerin analizi

Pirina ve karasudan elde edilmiş etanolik ekstraktlar içerisinde bulunan fenolik bileşenler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Bu maksatla elde edilmiş olan etanolik ekstraktlar 1:10 (w/v) oranında %80 etanol içerisinde çözündürülmüş 33 fenolik bileşen maddenin tarandığı fenolik bileşen analizleri Shimadzu marka HPLC (C18 ters-faz analitik kolonu Inertsil ODS-4 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm)) kullanılarak Köksal ve ark., (2017) tarafından detayları verilmiş yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre kolon sıcaklığı 40 °C'de sabit tutulup elüsyon gradienti mobil faz A (su, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ile oluşturulmuştur. MS tespiti Shimadzu LC-MS 8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynak işletimi ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapılmıştır. LC-MS/MS verileri Lab Solutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldıktan sonra çoklu reaksiyon takip işlemi (MRM) modu analizi ile ölçülmüştür (Köksal ve ark., 2017). Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.7 ICP-MS (indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi) ile mineral madde tayini

Pirina ve karasudan elde edilmiş etanolik ekstraktlar içerisinde bulunan mineral maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla ilk önce örnekler (100 mg) saf nitrik asit (10 mL) içerisinde 100 °C'de 3 saat yakılmıştır. Akabinde örnekler saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Akabinde örnekler filtreden (0.45 µm) geçirilerek ICP-MS (Agilent 7900 ICP-MS/ASX500) cihazı üzerinde analiz edilmiştir. Analiz için hedeflenen mineral maddeler: Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, ve Cd'dir. Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Fenolik Bileşen İlaveli Ekmek Üretimi

Ekmek denemeleri AACC-10/10 standart metodunun standart ticari beyaz ekmek yapım metoduna göre modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 100 g un esasına göre 1,5 g sofr tuzu, 3,0 g yaş maya, değişik oranlarda (0 g, 0.5 g, 1 g ve 2 g) ekstrakte edilmiş olan fenolik bileşenler ve su hamur yoğurma makinasında olgun homojen bir hamur elde edilinceye kadar yoğurulmuştur. Yoğurma işlemi tamamlanan hamur örnekleri, %75-80 nispi nem ve 30 °C sıcaklıkta fermantasyon kabininde, 2 defa 30 dakikalık kitle fermantasyonuna bırakılmış ve bu süreler sonunda katlanıp

havalandırılmıştır. Daha sonra ekmek hamurları eşit ağırlıkta kesilerek son şekil verilerek ve 30 °C’de 1 saat son fermentasyona tabi tutulmuş, fermentasyon sonunda hamurlar 230 ± 5 °C’ye ısıtılmış fırında 9 dakika süre ile fırında pişirilmiştir (Cankurtaran-Kömürcü ve Bilgiçli, 2023).

3.4.1 Ekmekte yapılan analizler

3.4.1.1 Duyusal analiz

Bazı fenolik bileşenler kendilerine özgü acımsı bir tada sahip olabilmektedir. İlaveten, fenolik bileşenler kendilerine özgü bir renge sahip olabilmekte ve dolayısıyla ilave edildiği gıdanın da rengini etkileyebilmektedir. Bu sebepten dolayı, ekmek üretimi neticesinde ilk olarak duyusal testler gerçekleştirilmiş ve optimum ekstrakt katkı oran(lar)ı belirlenerek ilerleyen analizler yürütülmüştür.

Karasu ve pirina fenolik ekstraktları içeren ekmek örneklerinin duyusal analizi, Necmettin Erbakan Üniversitesi'nde bulunan duyusal değerlendirme yapmaya elverişli, yaşları 18-50 arasında değişen, eğitimsiz, 20 panelist (personel ve/veya öğrenci) tarafından gerçekleştirilmiş olup, panelistlerden ekmekleri kabuk görünümü, ekmek içi görünümü, gözenek, koku, tat-aroma, çiğnenebilirlik ve genel beğeni bakımından 10 puan üzerinden değerlendirilmesi istenmiştir (Tok ve Ertaş, 2021). Değerlendirme sonucunda genel beğeni puanları >5 olan örneklerin reolojik, fiziksel, fonksiyonel ve teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla optimum seviyede karasu ve pirina fenolik ekstraktı içeren ekmek formülasyonu(ları) yeniden üretilerek aşağıda detayları verilmiş olan analizlere tabi tutulmuştur.

3.4.1.2. Hamur reolojisi

Hamur reolojisi ve son ürün arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmaktadır (Tuncil ve ark., 2016). Bu sebepten dolayı, üretim aşamasında hamur reolojisinin anlaşılması son ürünün kalitesi hakkında bilgi verebilmektedir. Fenolik bileşenlerin ekmek hamuru reolojisine etkilerini belirlemek için elde edilmiş olan hamurlarda aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir. Hamur örneklerinin reolojik özellikleri taze hamur ve 30 °C ve %80-90 rutubette 2 saat fermente edilmiş hamur örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Hamur örneklerinin tekstür profil analizinde (TPA) 30 kg’lık yük hücreesine sahip tekstür (TA.XT Plus, Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, İngiltere)

cihazı kullanılmıştır. Analiz parametreleri; pretest speed (teste başlamadan önceki hız): 1mm/sn, test speed (test anındaki hız): 5 mm/sn, posttest speed (test sonrası hız): 5 mm/sn, distance (sıkıştırma mesafesi):5 mm olarak belirlenmiştir (Bárcenas ve ark., 2010). Tektür profil analizi (TPA) için 10 gr'lık parçalara ayrıldıktan sonra yuvarlak şekil verilen hamur örnekleri kriyojenik bir silindire yerleştirilmiştir ve 36 mm çapındaki alüminyum silindir prob ile 10 mm/sn hızında %50'ye kadar iki sıkıştırma döngüsü uygulanmış ve sıkıştırmalar arasındaki süre 12 saniye olarak belirlenmiştir. Hamurun sertlik (hardness), yapışkanlık (Adhesiveness), elastikiyet (Springiness), koheziflik (Cohesiveness), sakızimsılık (Gumminess) ve esneklik (Resilience) değerleri belirlenmiştir. Analiz 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Gerilim-gevşeme analizi (s) (Stress Relaxtion Time) analizi yine tekstür (TA.XT Plus, Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, İngiltere) cihazı ve 25mm çapındaki prop ile Başar ve ark. (2021)'nin metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Analiz parametreler olarak; sıkıştırma kuvveti; test hızı: 2 mm/s; hedef modu:10 mm; tutma süresi: 120 s; tetik tipi: otomatik - 5 g. Gevşeme süresi (maksimum kuvvetin %36,8'inin azalması için gereken süre), tekstür analiz cihazından elde edilen eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Analiz 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Hamur örneklerinin yapışkanlık (stickiness (g)) değerleri Chen ve Hoseneý (1995)'in metodu esas alınarak tekstür analiz cihazı (TA.XT Plus, Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, İngiltere) ile belirlenmiştir. Ölçüm sırasında 25 mm çapında silindir bir prop (Dough Stickiness Rig (A/DSC)) kullanılmıştır. Analiz parametreleri olarak ön test hızı 0.5 mm/sn, test hızı 0.5 mm/s, son test hızı 10.00 mm/s, kuvvet 40 g ve temas süresi 0.1 s olarak belirlenmiş ve yapışkanlık değerleri 8 tekrarlı olarak ölçülmüştür.

3.4.1.3. Nişasta fraksiyonlarının (hızlı sindirilen, yavaş sindirilen ve dirençli nişasta) belirlenmesi ve glisemik indeks değerlerinin *in vitro* şartlar altında hesaplanması

Ekmek örneklerinde bulunan toplam nişasta miktarları Megazyme kiti kullanılarak AOAC 76-133.01 metodu dahilinde gerçekleştirilmiştir. Özetle 100 mg ekmek örneği 0.2 mL %80 etanol ilave edilerek vortekslenmiş üzerine 2 mL soğuk 1.7M NaOH ilave edilmiş tekrar vortekslenmiştir. Örnekler manyetik karıştırıcı üzerine alınıp soğuk su dolu kap içerisine yerleştirilip 15 dk karıştırılmıştır. Topaklanma

olmaması açısından 2-3 kez vortekslenmiştir. Süre sonunda 8 mL sodyum asetat (kalsiyum klorür içeren (5 mM)) (600 mM, pH: 3.8) eklenip, ardından 0.1 mL amilaz ve 0.1mL AMG (amiloglukozidaz) eklenerek 50 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakılan örneklerden 2 mL alınıp eppendorf tüplerine aktararak 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlardan 1 mL alınıp üzerine 4 mL sodyum asetat (kalsiyum klorür 5Mm içeren) (100 mM, pH: 5) ilave edilip karıştırılmıştır. Bu örneklerden 50 µl alıp üzerine 1.5 mL GOPOD eklendikten sonra 50 °C'de 20 dk inkübe edilip ardından spektrofotometre cihazında 510 nm'de okuma yapılmıştır.

Ekmek örneklerinde bulunan nişasta fraksiyonlarını belirlemek amacıyla deney tüplerine 200 mg örnek tartılıp üzerine 2 mL saf su ilave edilmiş ve 160 rpm'de kaynayan su banyosunda (95°C) 20 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler soğuması için (15dk) 37°C su banyosuna alınmıştır. Ardından 4 mL pepsin/guar gum/HCl çözeltisi eklenip, karıştırılmış ve 37°C'deki çalkalamalı su banyosuna 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 2 mL sodyum asetat tamponu (0.5M, pH: 5.2) ilave edilip vortekslenmiş ve 160 rpm'de 37°C'deki su banyosuna eğimli olarak yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 2 mL amilaz/AMG/invertaz enzim solüsyonu ilave edilerek ve çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında belirli sürelerde (0, 20, 60, 90 ve 120dk.) 50 µl örnekler alınarak ve enzim inaktivasyonu için 950 µl %90 etanol içeren eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüm örnekler toplandıktan sonra eppendorf tüpleri 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmından 50 µl alınarak üzerine 1.5 mL GOPOD ilave edilerek 50 °C'deki su banyosunda 20 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında örneklerin glikoz içerikleri spektrofotometrik olarak (510 nm'de) belirlenmiştir.

Ekmek örneklerinin glisemik indeks değerlerinin belirlenmesi amacıyla; 50ml hacimli santrifüj tüplerine 1 g ekmek örneği tartılmış üzerine 5 mL saf su ilave edilerek ultraturrax (1500rpm 10 sn) ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sonrasında 10 mL pepsin/guar gum/HCl çözeltisi ilave edilerek 37°C'deki su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örnek 250 mL hacimli erlen mayere alınması sonrasında saf su ile hacimleri 60 mL'ye tamamlanarak 0.5N sodyum asetat kullanılarak pH 5.0'a ayarlanmış ve son hacim saf su ile 100 mL'ye

tamamlanmıştır. Üzerine 1.7 mL pankreatin enzim süpernatantı ilave edilip çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında belirli sürelerde (20, 30, 60, 90, 120 ve 180 dk.) 0.5 mL örnekler alınarak cam deney tüplerine koyulmuş, enzim inaktivasyonu için kaynar su banyosunda bekletilmiş (5 dk), farklı dakikalarda alınan tüm örnekler toplanana kadar +4°C’ bekletilmiştir. Her bir örnek üzerine 4.5 mL saf su ilavesi sonrasında 8000 g’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 0.1 mL alınıp üzerine 3 mL GOPOD ilave edilerek 50°C’de 15 dk inkübasyona Süre sonunda örneklerin glikoz içerikleri spektrofotometrik olarak (510 nm’de) belirlenmiştir.

3.4.1.11. Nem analizi

Pirina ve karasu fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin nem içeriklerinin belirlenmesi amacıyla 135°C etüvde (Şekil 11) 2,5 saat bekletme normuyla AACC’nin Standart Metotlarından Metod 44–19’a göre yapılmıştır (AACC, 1999). Analiz her örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 11. Nem analizinde kullanılan etüv

3.4.1.12. Kül analizi

Pirina ve karasu fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin kül içerikleri 550°C’de (Daihan Wisetherm F-12, Gangwon, Güney Kore) açık gri renkli kül elde edilene kadar yakılmasıyla AACC 08–01 metoduna göre belirlenmiştir (AACC, 1999). Bu analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.13. Yağ analizi

Pirina ve karasu fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin toplam yağ içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Soxhlet esasına göre AACC Metot 30-25 kullanılmıştır (AACC, 1990). Ekmek örneklerinde bulunan yağ hegzan ile ekstrakte edilip, hegzan uzaklaştırılmış ve kalıntı sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş, tartılmış ve sonuç % olarak belirtilmiştir. Analiz her örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 12. Soxhlet yağ tayin cihazı

3.4.1.14. Protein analizi

Pirina ve karasu fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Dumas metoduna dayalı LECO azot tayin cihazı (LECO #FP828) kullanılmıştır. Dumas numune kaplarına 0,100 g örnek tartılmıştır. 850-950°C'lere ulaşan fırın sıcaklığına sahip cihazda örnekler helyum, oksijen ve kuru hava gazlarının yardımıyla yakılmış ve içerisinde bulunan azot miktarı hesaplanmıştır. Analiz 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.4. Enerji (kalori) değerlerinin hesaplanması

Fenolik bileşenler ilave edilerek üretilmiş olan ekmeklerin kalori (enerji) değerlerini hesaplamak maksadıyla, örneklerin nem, kül, yağ ve protein içerikleri sırasıyla AACC 44-19 (ekmekte nem tayini), AACC 08-01 (ekmekte kül tayini), AACC 30-25 (Soxhlet esasına göre) ve AACC 46-12 (Kjeldahl esasına göre) metotları ile belirlenmiştir (AACC, 2000). Toplam karbonhidrat miktarları; nem, ham protein, ham

yağ ve toplam kül tayini analizlerinden sonra her bir yan ürün için bu değerlerin toplamının 100'den çıkarılması ile belirlenmiş olup sonuçlar iki tekrar üzerinden ortalama değer alınarak yüzde olarak ifade edilmiştir. Örneklerin içerdiği diyet lifi içerikleri ise AOAC (Association of Official Analytical Chemists) tarafından onaylanmış (AOAC Official Method 991.43) olan enzimatik-gravimetrik metot ile belirlenmiştir. Diyet lifi analizi, her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin enerji değerleri kcal cinsinden aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Enerji} = (\text{Yağ} \times 9) + (\text{Protein} \times 4) + [(\text{Karbonhidrat} - \text{Diyet Lif}) \times 4] + (\text{Diyet Lif} \times 2)$$

3.4.1.5. Ağırlık hacim spesifik hacim ve kabuk kalınlıklarının belirlenmesi

Ekmekler, pişirmeyi takiben 45 dakika dinlendirildikten sonra ağırlıkları ve hacimleri ölçülmüştür. Hacim ölçümü kolza tohumu ile yer değiştirme esasına göre gerçekleştirilmiştir. Spesifik hacim değerleri ise ekmek hacminin ekmek ağırlığına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Elgün ve ark., 2001). Kabuk kalınlığı ise, numune ekmekten 10 mm kalınlığında düzgün kesit alınarak, dijital kumpas ile 3 noktadan ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.6. Ekmek örneklerinin kabuk ve iç renk değerlerinin belirlenmesi

Ekmek örneklerinin kabuk ve ekmek içi renk değerleri Minolta CR-400 (Konica Minolta, Inc., Osaka, Japonya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. L* (parlaklık), a* (kırmızı, yeşil) ve b* (sarı, mavi) değerleri saptanmıştır. Hue (renk özü) değeri arctan (b*/a*) formülü ile, SI (doymuluk indeksi) değeri ise (a*²+b*²)^{1/2} formülü ile hesaplanmıştır (Francis, 1998). Fenolik bileşenler içeren ekmek örnekleri için toplam renk değişikliği (ΔE) aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Peressini ve Sensidoni, 2009).

$$\Delta E = [(L^*_{\text{katkılı}} - L^*_{\text{şahit}})^2 + (a^*_{\text{katkılı}} - a^*_{\text{şahit}})^2 + (b^*_{\text{katkılı}} - b^*_{\text{şahit}})^2]^{1/2}$$

3.4.1.7. Ekmek örneklerinin tekstürel özelliklerinin belirlenmesi

Ekmek örneklerinin tekstür profil analizi (TPA), AACC tarafından belirtilmiş olan metot dahilinde (Method No: AACC 74-10.02) tekstür analiz cihazı (TA-TX2i,

Stable Micro System, Surrey, UK) ile gerçekleştirilmiştir. 3 mm/s test hızı ile çalışılmış, 36 mm çapındaki alüminyum ölçüm ucu kullanılarak ve 2.5 cm kalınlığında kesilmiş olan örnekler %50 gerinime (strain) sıkıştırılmış ve aynı işlem 10 s ara ile tekrarlanmıştır. Elde edilen kuvvet-süre grafiğinden sertlik (F), elastikiyet (t_2/t_1), kohesiflik (A_2/A_1), sakızimsılık, çignenebilirlik (sertlik x elastikiyet x kohesiflik) ve esneklik değerleri belirlenmiştir. Ekmekler 5 gün boyunca oda sıcaklığında kilitli polietilen ambalajlarda depolanarak, 1. ve 3. günlerde ölçüm yapılmıştır.

3.4.1.8. Ekstrakte edilmiş olan fenolik bileşenlerin ekmeğin küflenmesine etkisinin belirlenmesi

Fenolik bileşenler, antimikrobiyal özelliklerinden dolayı birçok gıda ürününde antimikrobiyal ajan olarak kullanım alanı bulmaktadır. Zeytinyağı endüstrisi atık ve artık ürünleri olan karasu ve pirinadan ekstrakte edilmiş olan fenolik bileşenlerin ekmeğin küflenmesini önleyici/geciktirici etki gösterip göstermediğini belirlemeye çalışılmıştır. Bu maksatla, ekmekler, doğal küflenmenin sağlanması maksadıyla 6 gün süreyle oda sıcaklığında depolanmış depolama süresi boyunca, 3., 4., 5. ve 6. günlerde örnekler toplanıp, aşağıda belirtilen yöntemle toplam küf sayımı yapılmıştır.

10 g öğütülmüş ekmek örneği steril stomacher poşetine tartılmış ve üzerine 90 mL serum fizyolojik (%0.85 tuz) eklenerek 30 sn stomacher cihazında (BagMixer 400P, Interscience Co., Fransa) homojenize edilmiştir. Homojenattan steril serum fizyolojik içeren tüplere transfer edilmek suretiyle seri dilüsyonlar (1:9) gerçekleştirilmiş ve uygun dilüsyonlardan alınarak Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agara yayma ekim yapılmıştır. 25°C sıcaklıkta 4 gün inkübasyon sonucunda petrilere sayım yapılarak ekmekteki toplam küf-maya sayısı belirlenmiştir.

3.4.1.9. Fenolik madde analizi

Serbest fenolik madde ekstraksiyonu Vitali ve ark. (2009)'da belirtilen metodun modifiye edilmesiyle yapılmıştır. 1 gram öğütülmüş ekmek örneği tartılıp üzerine 10 mL %1 HCl içeren %80 metanol ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında su banyosunda 2 saat çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, analizde kullanıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bağlı fenolik madde ekstraksiyonu için Vitali ve ark. (2009)'da belirtilen metodun modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bağlı fenolik maddelerin ekstraksiyonunda serbest fenoliklerin ekstraksiyonundan arta kalan pelet kullanılmıştır. Pelet üzerine 10 mL 10:1

oranından metanol:H₂SO₄ karışımı ilave edilerek çalkalamalı su banyosunda 80 C’de 20 saat bekletilmiştir. Süre sonunda 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip, analizde kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Pirina ve karasudan ekstrakte edilen fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin serbest ve bağlı fenolik madde miktarı Nack ve Shahidi (2004)’nin belirlediği Folin Ciocalteu reaktifinin kullanıldığı metodun modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Mikro küvetlere 100 µl örnek ekstraktı alınıp üzerine 1.9 mL Lowry çözeltisi ve 0.25 mL folin (%10’luk, h/h, suda) eklenmiştir. Mikro küvetlerin üzeri kapatılarak oksijen alması engellenmiş halde 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Spektrofotometre cihazı (Hitachi-U1800, Japonya) ile 760 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden ifade edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı serbest ve bağlı fenolik miktarlarının toplanması ile elde edilmiştir.

3.4.1.10. Antioksidan analizleri

Pirina ve karasudan ekstrakte edilen fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin antioksidan aktivite analizi için DPPH ve FRAP metotları kullanılmıştır. Analizler 3 tekrürlü yapılmıştır.

Ekmek örnekleri dondurarak kurutucu yardımıyla kurutulmuş, ardından kahve öğütücüsünden geçirilmiştir. Öğütülen ekmek örnekleri 1 g tartılmış ve üzerine 10 ml %80’lik metanol eklenmiştir. Çalkalamalı su banyosunda (Daihan Wisebath WAB-30, Gangwon, Güney Kore) 2 saat çalkalanmıştır. Süre sonunda 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip, süpernatantlar şırınga uçlu filtreden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar kullanılarak, örneklerin antioksidan kapasiteleri, detayları sırasıyla 3.3.4.1. ve 3.3.4.2. başlıkları altında verilen DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenmiştir.

3.4.1.10.1 DPPH

Pirina ve karasudan ekstrakte edilen fenolik bileşen ilaveli ekmek örneklerinin antioksidan aktivite analizi Gyamfi ve ark. (1999) ile Beta ve ark. (2005)’nin metotlarının modifiye edilmesi sonucunda kullanılmıştır. 100µl örnek ekstraktına 3.9 ml

DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) çözültisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda spektrofotometre cihazında (Hitachi-U1800, Japonya) 517 nm dalga boyunda absorban değerleri okunmuştur. Cihaz kör ile sıfırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar trolox cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.1.10.2. FRAP

Pirina ve karasudan ekstrakte edilen fenolik bileşen ilaveli ekme örneklerinin antioksidan aktivite analizinde DPPH metodu için Gao ve ark. (2000)' nin metodu kullanılmış olup, 10:1:1 oranında sırasıyla 300 mmol/L asetat tamponu, 10mmol/L TPTZ çözültisi e 20 mmol/L FeCl₃6H₂O karıştırılmış, analizde kullanılacak olan FRAP çözültisi hazırlanmıştır. 50 µl örnek ekstraktına 0.7 ml FRAP çözültisi ilave edilerek oda sıcaklığına ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda spektrofotometre cihazında 593 nm dalga boyunda absorban değerleri okunmuştur. Elde edilen sonuçlar trolox cinsinden ifade edilmiştir. Analizler üç tekerrürlü yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraktların Besinsel Kompozisyonu

4.1.1. Protein, kül, basit şeker ve toplam fenolik madde analiz sonucu

Pirina ve karasudan elde edilen etanolik ekstraktların protein, kül, basit şeker ve toplam fenolik madde içerikleri Çizelge 4' te verilmiştir. Pirina ekstraktının protein ve kül içeriklerinin sırasıyla %2.55 ve %4.55; karasu ekstraktlarının ise protein ve kül içeriklerinin ise sırasıyla %1.57 ve %4.48 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Pirina ve karasu ekstraktlarının besinsel kompozisyonu (%)

	Pirina	Karasu
Protein	2.55±0.05+	1.57±0.13+
Kül	4.55±0.02	4.48±0.12
Toplam Basit Şeker**	26.3±0.00+	31.4±0.01+
Glikoz	16.78±0.00	16.49±0.00
Fruktoz	9.51±0.00+	14.86±0.01+
Toplam Fenolik Madde	5.45±0.10+	2.41±0.15+

*Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ** Toplam basit şeker = glikoz + fruktoz

+ Pirina ve karasu ekstraktları besinsel içerikleri (protein, kül, toplam basit şeker, toplam fenolik madde) açısından istatistiksel analize tabi tutulmuş olup besinsel bileşen miktarları farklı olanlar + işareti ile gösterilmiştir. $p < 0.05$, student t test

Protein ve kül içeriklerine ilaveten, elde edilen ekstraktların içermiş oldukları glikoz, fruktoz ve sakkaroz miktarları HPLC/RID cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktlarda sakkaroz tespit edilmemiş olmasına rağmen, önemli miktarlarda glikoz ve fruktoz içerdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4). Pirina etanolik ekstraktının glikoz ve fruktoz içeriklerinin sırasıyla %16.8 ve %9.5 olduğu, bu değerlerin karasu etanolik ekstraktlarında ise sırasıyla %16.5 ve %14.9 olduğu tespit edilmiştir. Etanolik ekstraktların toplam basit şeker içerikleri ise, içerdikleri glikoz ve fruktoz miktarlarının toplanması sonucu (toplam basit şeker = glikoz + fruktoz) hesaplanmış olup, bu değer pirina ve karasu etanolik ekstraktları için sırasıyla %26.3 ve %31.4 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, elde edilen pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının yüksek miktarda basit şeker içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada zeytin posasında bulunan ana şekerin glikoz, fruktoz ve galaktoz olduğu bildirilmiştir (Marsilio ve ark., 2000). Glikoz, fruktoz ve galaktoz için kuru ağırlık bazında mg/100 g cinsinden ifade edilen sonuçlar sırasıyla 2052-5420, 134-1196 ve 85-1360 arasında

değiştirdiği belirtilmiştir (Marsilio ve ark., 2000). Yapılan başka bir çalışmada üç farklı zeytin çeşidinde glikoz fruktoz ve galaktoz miktarlarının mg/kg cinsinden 1102-2474, 524-916, 135-276 arasında değiştiği bildirilmiştir (Issaoui ve ark., 2011). Bu durum, zeytinin sahip olmuş olduğu yüksek şeker içeriklerinden ve ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücü içerisinde basit şekerlerin çözünebilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Alves ve ark. 2007; Klinchongkon ve ark., 2022).

Pirina ve karasudan elde edilen etanolik ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri spektrofotometrik yöntemle belirlemiş olup, ekstraktların fenolik içerikleri sırasıyla 5.45 ± 0.10 ve 2.41 ± 0.15 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). Etanol ekstraksiyonu sonucu örneklerde tespit edilmiş olan nispeten düşük toplam fenolik madde içeriği, örneklerin yüksek miktarda toplam basit şeker içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlaveten, metot kısmında detayları verilen, fenolik bileşen eldesi için kullanılmış olan yöntemin, pirina ve karasudan fenolik bileşen için optimum ekstraksiyon metodu olup olmadığını belirlenmesi maksadıyla, 22 farklı ekstraksiyon yöntemi bu tez projesi bünyesinde denenmiş ve elde edilen sonuçlar (kullanılan yöntem ile) detaylı olarak Ekler bölümünde verilmiştir (EK-1). EK-1’de verilen veriler incelendiğinde, yöntem kısmında belirtilen metodun, bu çalışmada test edilmiş olan metotlara kıyasla, en optimum düzeyde pirina ve karasudan fenolik ekstraksiyonunu sağlayan metot olduğu görülebilmektedir.

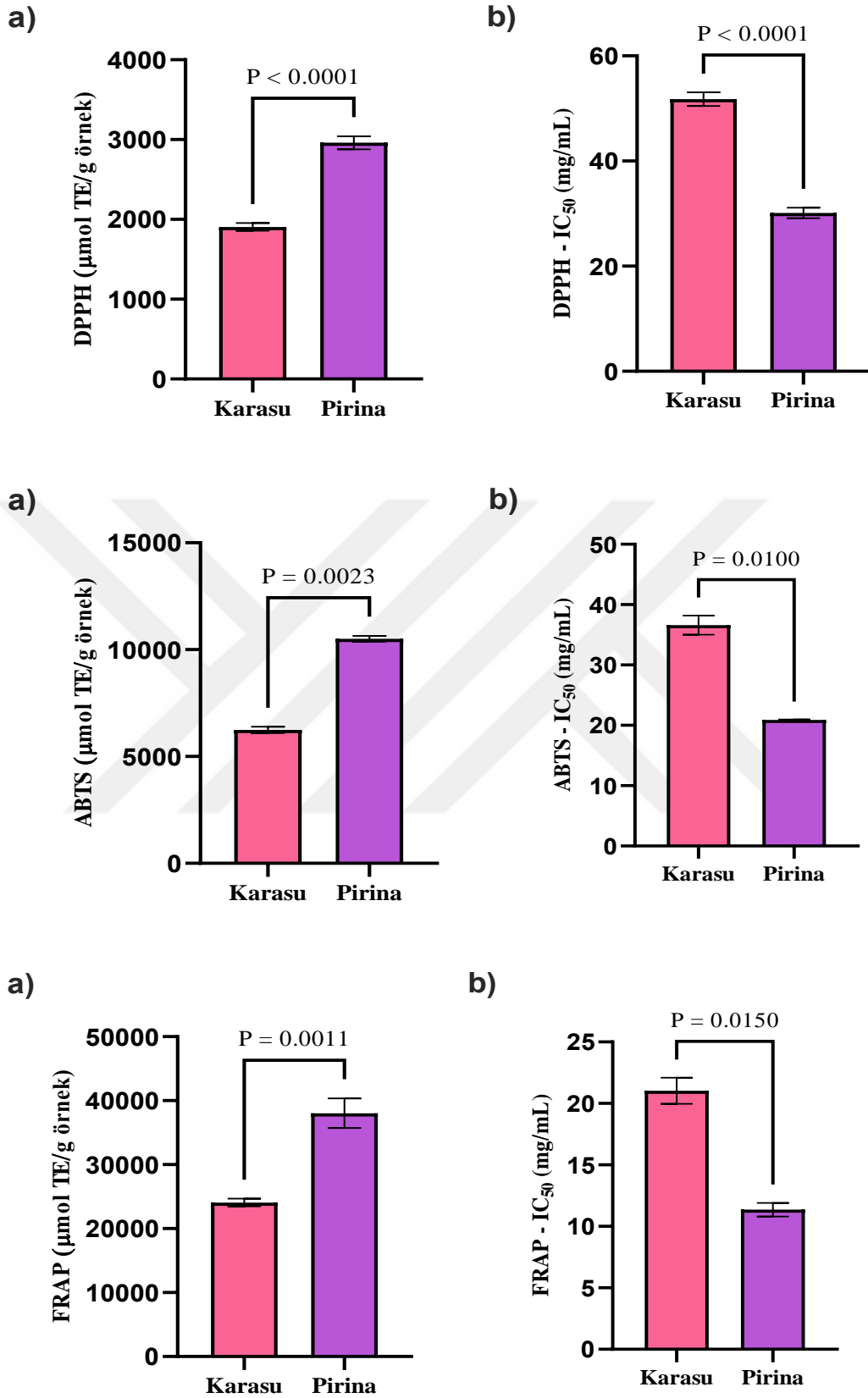
Literatürde daha önce pirina ve karasu fenolik maddeleri üzerine yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, verilerin genellikle 1 g pirinadan ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarları (1 g pirinadan toplam fenolik madde ekstraksiyon etkinliği) üzerinden verildiği görülmektedir. Literatürde rapor edilmiş olan veriler ile bu tez çalışmasında ulaşılmış olan toplam fenolik madde ekstraksiyon etkinliğinin kıyaslanabilmesi maksadıyla, bu çalışmada %TFM miktarına ilaveten, 1 g pirinadan ekstrakte edilmiş toplam fenolik madde miktarı da hesaplanmış olup, bu değer 10.22 mg GAE/g kuru pirina olarak bulunmuştur (GAE: gallik asit eşdeğeri). Literatürdeki çalışmalar dikkate alındığında, örneğin Alu’dat ve ark. (2010) pirinadaki fenolik maddeleri elde etmek için uyguladıkları çalışmada pirina örneklerine farklı ekstraksiyon sıcaklığı (25, 40, 50, 60, 70°C) ve süresi (1, 3, 6, 9, 12 saat) uygulayarak, toplam fenolik madde açısından optimum parametreyi belirlemişlerdir. Optimum koşul olarak; 70 °C, 12 saat ve ekstraksiyon solventi olarak metanolün olduğunu ve pirinada fenolik madde değerini 4.07 mg GAE/g kuru ağırlık olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada Tapia-

Quiros ve ark., (2020) pirinadaki toplam fenolik madde içeriğini belirlemek için 3 farklı ekstraksiyon (ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu) yöntemini kullanmışlardır. 20 °C’de 30 dakika %50 (v/v) etanol solvent ile yapılan ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin en etkin yöntem olduğunu tespit etmişler ve bu yöntem sonucunda ekstraksiyon etkinliğinin 8.05 mg GA/g pirina olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma sonucu elde edilen verimliliğin (fenolik ekstraksiyon etkinliğinin), Quiros ve ark., (2020) ve Alu’dat ve ark., (2010) tarafından rapor edilen etkinlikten daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Tapia-Quiros ve ark. (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada pirinada en iyi ekstraksiyon verimliliği mikrodalga destekli ekstraksiyonda (etanol:su 50:50 (v/v) 90 °C ve 5 dakika) yaklaşık 10.00 mg GA/g kuru pirina olarak bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada bulunan değerlerle verilerimizin uyumlu olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, Goldsmith ve ark., (2017) yapmış oldukları çalışmadan pirinadan fenolik ekstraksiyon etkinliğinin 19.71 ± 1.41 mgGAE/g olduğunu tespit etmişlerdir. Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamızda elde ettiğimiz verilerimizin, bazı çalışmalardaki değerlerden düşük olduğu görülürken (Goldsmith ve ark., 2017), bazılarında yüksek olduğu (Andreou ve ark., 2020; Bruno ve ark., 2018; Cardinali ve ark., 2024; Marinopoulou ve ark., 2020) kaydedilmiştir. Bunun nedeni olarak çalışmalarda kullanılan solvent polaritesi (Bruno ve ark., 2018), pH, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı gösterilebilir. İlaveten, çalışmalar arası elde edilen farklı sonuçlar (farklı fenolik ekstraksiyon verimlilikleri), hammaddelerin (zeytinin) yetiştiği farklı coğrafya-toprak, yetiştirme uygulamaları, olgunluk, hasat zamanı, iklim koşulları, tarım uygulamaları ve depolama sürelerinden kaynaklanmış olabilir, çünkü zeytinin besinsel kompozisyonu yukarıda bahsedilen çevresel ve hasat şartlarından etkilenebilmektedir. (Ghanbari ve ark., 2012; Boskou 1996; Pereira ve ark., 2006; Portarena ve ark., 2017).

4.1.2. Antioksidan aktivite analizleri

Pirina ve karasudan elde edilen fenolik ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP metotları kullanılarak ayrı ayrı belirlenmiş olup, sonuçlar, görselliğin daha iyi sağlanabilmesi açısından hem çizelge (Çizelge 5) hem de şekil olarak (Şekil 13) verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, pirina etanolik ekstraktlarının, karasudan elde edilene kıyasla, daha yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumun, pirina ekstraktlarının, karasudan elde edilene kıyasla, daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine (Çizelge 4) sahip

olmasından dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, Cedola ve ark. (2020) hem ABTS hem de FRAP metotları kullanarak gerçekleştirmiş oldukları çalışma sonucunda, pirina fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitelerinin karasudan elde edilen muadillerine göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Nunes ve ark. (2021), zeytinyağı üretimi atıklarından olan pirinadaki fonksiyonel bileşenleri ekstrakte edip, antioksidan aktivitesini farklı yöntemlerle (DPPH ve ABTS) belirledikleri çalışmada, DPPH yöntemi ile elde ettikleri değerlerin 0.60-0.96 g TE/100g arasında değiştiğini bildirirken, ABTS metodu ile elde ettikleri değerlerin 0.80-1.13 g TE/ 100g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Bruno ve ark. (2020), tarafından gerçekleştirilmiş olup, karasu ve pirinadaki (4 farklı zeytin çeşidinin atıkları) antioksidan içeriklerini (DPPH ve ABTS) sırasıyla; 0.49-59.37 ve 27.43-155.29 μmol Trolox/g, 281.70-2591.66 ve 779.55- 4795.45 μmol Trolox/g olarak rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Marinopoulou ve ark (2020) siyah ve yeşil zeytin posasını fonksiyonel gıda üretmek amacıyla kullanmış olup, öncesinde posaların kimyasal kompozisyonları belirlemişlerdir. Siyah zeytin posasında antioksidan aktivite değerlerini (ABTS, FRAP ve DPPH) sırasıyla 4.35, 4.77, 4.42 mg TE/g olarak belirlemişlerdir (Marinopoulou ve ark., 2020). Yukarıda verilen tüm literatür verileri ile bu çalışma kapsamında elde edilen değerler kıyaslandığında, elde ettiğimiz sonuçların oldukça yüksek olduğu kaydedilmiştir. Bu farkın sebebi; zeytin meyvesinin çeşidi (Bruno ve ark., 2020), besinsel kompozisyonu, ihtiva ettiği fenolik madde miktarı, çevre koşulları, ekstraksiyonda kullanılan süre sıcaklık ve çözücü gösterilebilir (Kiritsakis ve ark. 1998)



Şekil 13. Pirina ve karasu ekstraktlarının DPPH ABTS ve FRAP metodu üzerinden belirlenmiş antioksidan kapasiteleri

Çizelge 5. Pirina ve karasu ekstraktlarının antioksidan aktivite sonuçları

		Pirina	Karasu
DPPH	($\mu\text{mol TE/g}$)	2960.73 \pm 161.95*	1906.61 \pm 96.03*
	IC ₅₀ (mg/ml)	30.12 \pm 2.01*	51.77 \pm 2.56*
ABTS	($\mu\text{mol TE/g}$)	10507.04 \pm 188.91*	6243.94 \pm 220.09*
	IC ₅₀ (mg/ml)	20.92 \pm 0.07*	36.62 \pm 2.24*
FRAP	($\mu\text{mol TE/g}$)	38036.27 \pm 4624.56*	24071.28 \pm 1194.19*
	IC ₅₀ (mg/ml)	11.36 \pm 0.78*	21.03 \pm 1.50*

* ile gösterilen örnekler arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. $p < 0.05$ (student t testi)

4.1.3. Antimikrobiyal aktivite analizleri

Pirina ve karasudan ekstrakte edilmiş olan fenolik bileşenlerin (etanolik ekstraktların) antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, hem gıda kaynaklı hem de insan patojeni olan bakterilerden gram pozitif olarak *S. aureus* NCTC 8530, *B. subtilis* NRRL-B209, *B. spizizenii* ATCC 6633, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. faecalis* ATCC 19433, *M. luteus* NCIMB 8166 gram negatif olarak ise *E. coli* ATCC 8739 ve *P. aureginosa* ATCC 9027 suşları kullanılırken, mayalardan *T. delbrueckii* DSM 70504, *S. cerevisiae* D 1246, *C. albicans*; küflerden ise *A. niger* DSM 2466, *P. brevicompactum* DSM 2215 model mikroorganizmalar kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için disk difüzyon (Şekil 16) ve kuyucuk (Şekil 17) yöntemleri olmak üzere iki farklı teknik kullanılmıştır. Bakteriler için ampicilin ve chloramphenicol antibiyotikleri; maya ve küfler için ise amfotericin B ve Nystatin antibiyotikleri pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, her bir yöntem için ayrı ayrı aşağıda sunulmuştur.

4.1.3.1 Disk difüzyon yöntemi

Farklı konsantrasyonlardaki pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının bazı gıda kaynaklı ve insan patojeni mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri (disk difüzyon yöntemi (Şekil 14)) sırasıyla Çizelge 6 ve Çizelge 7'de verilmiştir. Ne pirina ne de karasu etanolik ekstraktlarının test edilen küfler ve mayalar üzerine herhangi bir antimikrobiyal etkilerinin olmadığı görülmektedir (Çizelge 6 ve Çizelge 7). Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının bakteriler üzerine ise farklı düzeylerde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Karasu etanolik ekstraktının *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* üzerine herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği

(Çizelge 7), ancak pirina etanolik ekstraktlarının bu bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hem karasu hem de pirina etanolik ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin konsantrasyona göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin, *B. spizizenii* hariç diğer tüm bakterilere karşı pirina etanolik ekstraksiyonunun minimum antimikrobiyal etki konsantrasyonunun 100 mg/mL olduğu belirlenmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Farklı konstantrasyonlardaki pirina etanolik ekstraktının bazı gıda kaynaklı ve insan patojeni mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapları, mm – disk difüzyon yöntemi).

Mikroorganizm	Amphicilin	Chloramphenicol	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. aureus</i>	37.55 ± 0.92	28.5 ± 3.96	6.5 ± 0.28	6.75 ± 0.07	-	-
<i>E. coli</i>	16.7 ± 1.27	23.45 ± 0.07	6.25 ± 0.07	7.3 ± 0.28	7.05 ± 0.49	-
<i>P. aureginosa</i>	16.5 ± 0.99	23.7 ± 0.42	6.4 ± 0.28	6.25 ± 0.21	7.1 ± 0.42	-
<i>B. subtilis</i>	30.95 ± 0.35	30.8 ± 0.14	7.1 ± 0.42	7.2 ± 0.14	7.2 ± 0.42	-
<i>B. spizizenii</i>	34 ± 0.57	32.2 ± 0.57	7 ± 0.14	6.7 ± 0.14	7.5 ± 0.42	6.55 ± 0.07
<i>M. luteus</i>	40.95 ± 0.78	28.8 ± 2.26	7.25 ± 0.21	7.8 ± 0.14	6.9 ± 0.28	-
<i>L. monocytogenes</i>	32.6 ± 1.56	30 ± 1.13	6.85 ± 0.78	7.8 ± 0.14	7.1 ± 0.85	-
<i>E. faecalis</i>	22.35 ± 0.21	23.75 ± 1.06	6.9 ± 0	7.35 ± 0.07	7.2 ± 0.42	-
	Amfotericin B	Nystatin	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. cerevisiae</i>	8.2 ± 0.21	25.3 ± 0.14	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	8 ± 0.42	24.35 ± 0.35	-	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	9.15 ± 0.49	28.7 ± 0.42	-	-	-	-
<i>P.brevicompectum</i>	6.7 ± 0.14	21.6 ± 0.28	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	10.1 ± 0.14	20.8 ± 0.28	-	-	-	-

* Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

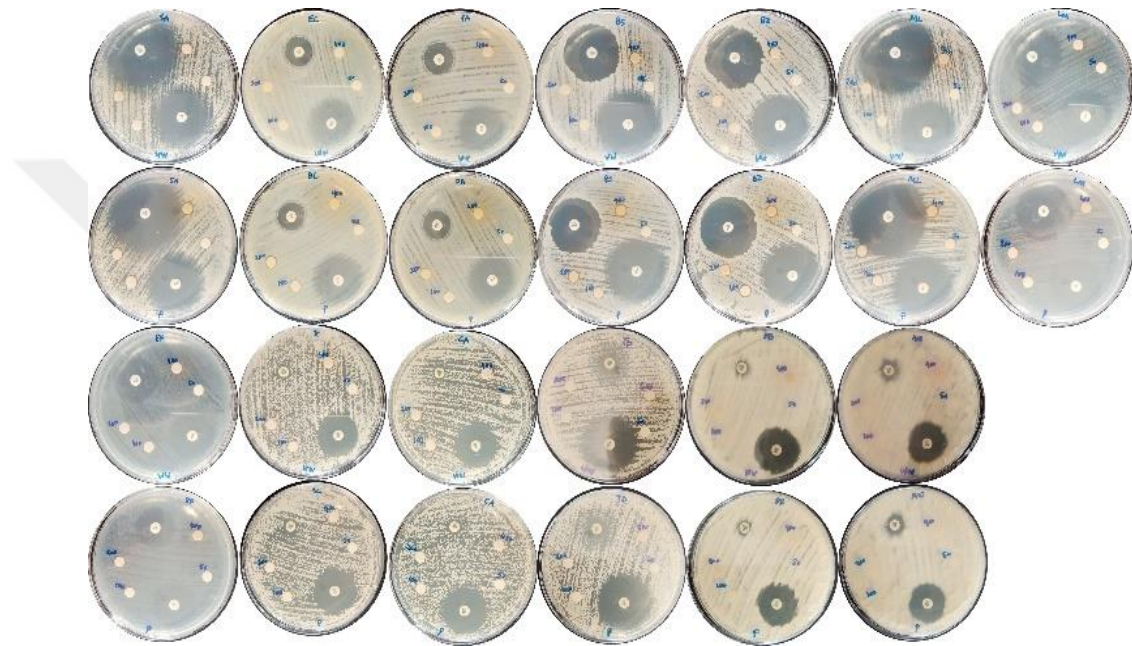
Karasu etanolik ekstraktına kıyasla, pirina etanolik ekstraktlarının daha fazla antibakteriyel etki göstermesinin sebebi, pirina etanolik ekstraktlarının daha yüksek miktarda fenolik bileşen içermesinden (Çizelge 4) dolayı kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 7. Farklı konstantrasyonlardaki karasu etanolik ekstraktının bazı gıda kaynaklı ve insan patojeni mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapları, mm – disk difüzyon yöntemi).

Karasu	Amphicilin	Chloramphenicol	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. aureus</i>	38.8 ± 1.98	27.2 ± 0	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	17.35 ± 0.35	25.25 ± 1.06	-	-	-	-
<i>P. aureginosa</i>	17.3 ± 1.41	24.05 ± 0.21	7.8 ± 0.28	6.55 ± 0.21	8.55 ± 3.04	-
<i>B. subtilis</i>	32.15 ± 1.48	35.8 ± 1.98	6.85 ± 0.07	6.45 ± 0.07	-	-
<i>B. spizizenii</i>	34.25 ± 0.21	31.25 ± 2.47	6.75 ± 0.21	-	-	-
<i>M. luteus</i>	41.6 ± 0.28	30.55 ± 0.49	-	-	-	-

	Amfotericin B	Nystatin	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>L. monocytogenes</i>	32.6 ± 0.14	26 ± 0.57	-	-	-	-
<i>E. feacalis</i>	24.85 ± 0.78	23.2 ± 0.14	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	8.4 ± 0.28	25.1 ± 0.99	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	7.85 ± 0.21	24.1 ± 0.85	-	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	9.8 ± 0.42	28.5 ± 0.71	-	-	-	-
<i>P.brevicompectum</i>	6.75 ± 0.07	24.15 ± 0.78	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	9.5 ± 0.42	21.5 ± 0.57	-	-	-	-

* Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 14. Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Analiz Ekimi

4.1.3.2. Kuyucuk yöntemi

Kuyucuk yöntemi (Şekil 15) ile antimikrobiyal aktivite tayini sonucu elde edilmiş olan veriler pirina etanolik ekstraktı için Çizelge 8’de, karasu etanolik ekstraktı için ise Çizelge 9’da verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde test edilen küfler ve mayalar üzerine ne pirina ne de karasu etanolik ekstraktlarının herhangi bir antimikrobiyal etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 8 ve 9). Karasu etanolik ekstraktının *E. coli*, *P. Aureginosa*, *B. subtilis*, *B. spizizenii*, *M. Luteus*, *L. monocytogenes* ve *E. feacalis* üzerine herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği yalnızca *S. aureus* üzerine etki gösterdiği (çizelge 9), ancak pirina etanolik ekstraktlarının bu bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin

olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin konsantrasyona göre farklılık gösterdiği tespit edilmiş olup, pirina etanolik ekstraktının antimikrobiyal etkisinin karasu etanolik ekstraktına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak pirina etanolik ekstraktında bulunan fenolik bileşen miktarının karasu etanolik ekstraktında bulunana kıyasla daha fazla olması (Çizelge 4) gösterilebilir.

Çizelge 8. Farklı konsantrasyonlardaki pirina etanolik ekstraktının bazı gıda kaynaklı ve insan patojeni mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapları, mm).

Pirina	Amphicilin	Chloramphenicol	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. aureus</i>	37.8 ± 0.28	27.45 ± 0.35	10.5 ± 0.14	8.45 ± 0.35	-	-
<i>E. coli</i>	17.35 ± 1.2	22.6 ± 0.14	9.6 ± 0.28	7.3 ± 0.14	-	-
<i>P. aureginosa</i>	17.3 ± 0.28	23.85 ± 0.21	8.9 ± 0.14	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	27.55 ± 5.02	29.8 ± 1.98	10.55 ± 0.07	8.55 ± 0.35	-	-
<i>B. spizizenii</i>	31 ± 0.42	30.55 ± 0.49	10.5 ± 0.28	8.6 ± 0	-	-
<i>M. luteus</i>	41.2 ± 0.85	19.22 ± 14.73	8.25 ± 1.77	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	31.85 ± 1.06	26.75 ± 0.07	9.95 ± 0.21	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	24.7 ± 0.14	22.25 ± 1.34	11.35 ± 0.07	9 ± 0.57	-	-
	Amfotericin B	Nystatin	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. cerevisiae</i>	7.55 ± 0.21	25.9 ± 0.14	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	8.75 ± 0.35	24.75 ± 0.35	-	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	9.85 ± 0.64	29.65 ± 1.2	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	6.85 ± 0.07	23.4 ± 0	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	13 ± 0.57	10.75 ± 1.06	-	-	-	-

* Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 9. Farklı konstantrasyonlardaki karasu etanolik ekstraktının bazı gıda kaynaklı ve insan patojeni mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapları, mm – kuyucuk yöntemi).

Karasu	Amphicilin	Chloramphenicol	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. aureus</i>	35.15 ± 0.92	22.55 ± 0.07	9.7 ± 1.13	-	-	-
<i>E. coli</i>	16.75 ± 0.35	23.5 ± 0	-	-	-	-
<i>P. aureginosa</i>	16.8 ± 0.14	23.1 ± 0.42	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	28.8 ± 1.27	30.7 ± 0.57	-	-	-	-
<i>B. spizizenii</i>	30.65 ± 0.78	30.2 ± 0.85	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	40.85 ± 1.06	30.4 ± 1.56	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	33.5 ± 0.99	30.3 ± 0.99	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	23.5 ± 0.28	23.7 ± 2.83	-	-	-	-

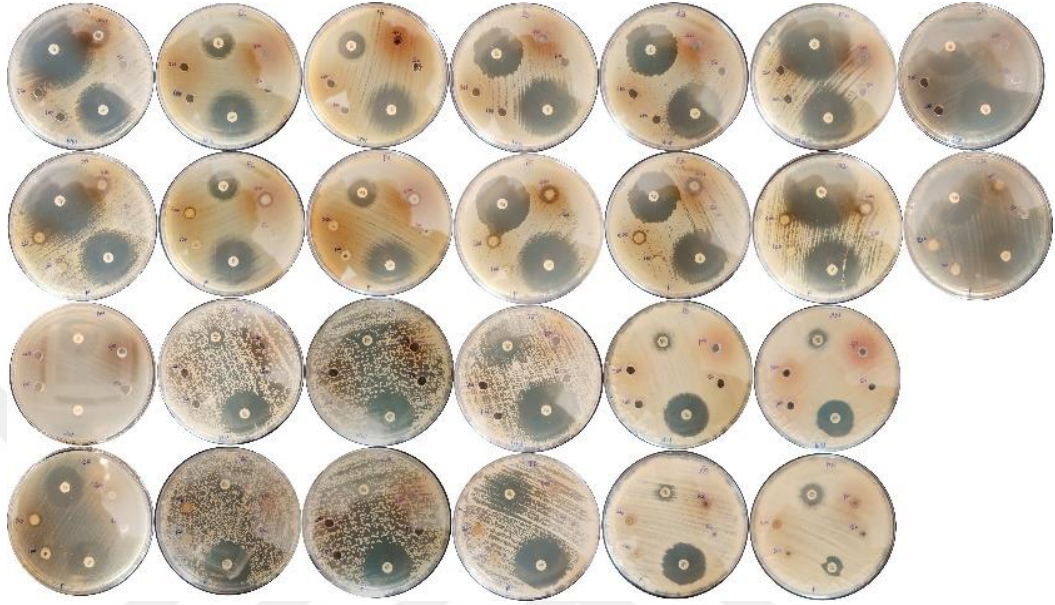
	Amfotericin B	Nystatin	400 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. cerevisiae</i>	8.9 ± 0.85	25.5 ± 1.84	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	9.5 ± 0.57	25.8 ± 0.28	-	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	9.7 ± 0.57	29.4 ± 1.27	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	6.5 ± 0.28	23.1 ± 0.57	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	10.35 ± 0.64	26.6 ± 0.99	-	-	-	-

* Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir

Literatürde verilen çalışmalardan; Yakhlef ve ark. (2018), 3 farklı zeytinden (Blanquette, Rouquette ve Sigoise) ürettikleri zeytinyağlarının ve atıklarının (pirina-karasu), *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. Fluorescens* suşları üzerine mikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Karasuyun, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. fluorescens* mikrobiyal suşları üzerinde minimum bakteri yok edici konsantrasyonunu belirlemişler ve en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi en yüksek fenolik içeriği bulunan karasu örneklerinde elde etmişlerdir. Toplam polifenol konsantrasyonu %2.5 olduğu zaman test edilen 4 suşda (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. Fluorescens*) 3 log azalma meydana geldiğini bildirmişler. Rouquette çeşidinin ise antimikrobiyal etkisinin 4 suşun üzerindeki minimum konsantrasyonunu %60 ve üzerinde olduğunu bildirmiş ve bu antimikrobiyal aktivite farklılığını, farklı fenolik içeriğine atfetmişlerdir (Yakhlef ve ark., 2018).

Bir başka çalışmada Nunes ve ark. (2021), Alfândega-da-Fé, Valpaços, Beja ve Ferreira do Alentejo zeytin çeşitlerinden elde ettikleri pirina ekstraktlarının *E.coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Bu analiz sonucunda *E. coli* için minimum antibakteriyel konsantrasyonun Alfândega-da-Fé çeşidinden elde edilen pirina ekstraktında 62.5 mg/ml (diğer çeşitlerde 125.0 mg/ml) olarak; *S. aureus* için ise Alfândega-da-Fé ve Beja çeşidinden elde edilen pirina ekstraktlarında 31.25 mg/ml (Valpaços çeşidi pirina ekstraktında 62.5 mg/ml; Ferreira do Alentejo çeşidi pirina ekstraktında ise 125 mg/ml) olarak bildirmişlerdir (Nunes ve ark., 2021). Dolayısı ile yapılan çalışmalar dikkate alındığında, fenoliklerin yapılarında OH gruplarının yer alması sebebiyle reaktif oksijen ve nitrojen türleri nötralize edilmekte ve böylece antioksidan etki gösterilmektedir. Bunların yanı sıra metalleri şelatlama yetenekleri sayesinde serbest radikal oluşumu da yavaşlatılmaktadır. Antimikrobiyal etkilerinin bir diğer özelliği fenolik konsantrasyonu ve fenolik yapılarına dayandırılmaktadır (Nunes ve ark.2021; Gyawali ve İbrahim, 2014) çünkü, flavonoidler ve fenolik asitler fungusit aktiviteye sahip bileşenler olarak tanımlanmışlar.

Bu yüzden, fenolik bileşiklerin engelleyici etkisinin, yapısında bulunan OH gruplarının bakterilerin hücre yapısıyla etkileşime girmesiyle zar yapısını bozabileceği ve hücrel bileşenlerin sızmasını sağlaması sonucunda ortaya çıktığı düşünülebilir (Lai ve Roy 2004; Xue ve ark., 2013; Gyawali v e İbrahim, 2014).



Şekil 15. Kuyucuk metodu ile Antimikrobiyal Analiz Ekimi

4.1.4 LC-MS/MS ile fenolik bileşen analiz sonucu

Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının fenolik kompozisyonları, LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Sonuçlar miktar cinsinden Çizelge 10’da nisbi bolluk cinsinden ise Çizelge 11’ de verilmiştir.

Çizelge 10. Pirina ve karasu ekstraktlarının miktar cinsinden fenolik kompozisyonları

Bileşen Adı	Miktar \pm standart sapma (ng/mg)	
	Pirina	Karasu
(-)-Epicatechin	-	-
(+)-Catechin	0.32 \pm 0.26	-
2,5-Dihydroxybenzoic acid	-	-
2-Hydroxycinnamic acid	-	-
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	0.37 \pm 2.47	0.14 \pm 0.7
3-Hydroxybenzoic acid	-	-
3-hydroxytyrosol	262.42 \pm 39.89*	109.55 \pm 13.48*
4-Hydroxybenzoic acid	29.20 \pm 6.54*	10.51 \pm 0.66*

Apigenin 7-glucoside	124.56 ± 22.54*	22.64 ± 4.4*
Apigenin	68.23 ± 12.16*	0.57 ± 3.11*
Caffeic acid	143.58 ± 25.12*	33.45 ± 21.76*
Chlorogenic acid	5.62 ± 3.38*	3.95 ± 1.61*
Eriodictyol	0.40 ± 0.41	-
Ferulic acid	19.84 ± 1.33*	5.12 ± 3.98*
Gallic acid	-	-
Hesperidin	100.74 ± 1.01*	17.80 ± 6.5*
Homovanillic acid	17.98 ± 11.58*	3.15 ± 3.85*
Hyperoside	50.94 ± 21.35*	6.84 ± 7.2*
Kaempferol	4.99 ± 5.88	-
Luteolin 7-glucoside	282.91 ± 4.44*	87.99 ± 12.33*
Luteolin	458.65 ± 4.74*	42.01 ± 40.22*
Oleuropein	131.64 ± 35.02*	82.98 ± 6.6*
p-Coumaric acid	90.93 ± 6.22*	29.36 ± 10.77*
Pinosesinol	19.11 ± 41.7*	0.43 ± 1.51*
Protocatechuic acid	37.90 ± 13.95*	17.50 ± 3.52*
Pyrocatechol	3.18 ± 7.79	-
Quercetin	104.04 ± 21.81*	2.18 ± 12.81*
Rosmarinic acid	-	-
Sinapic acid	-	-
Syringic acid	-	-
Taxifolin	0.59 ± 0.5	-
Vanillic acid	71.03 ± 89.87	41.97 ± 40.89
Vanillin	9.61 ± 11.95	-
Verbascoside	98.04 ± 13.14*	13.81 ± 3.13*

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, çizelgedeki değerler ort±std sapma değerini göstermektedir.

Pirina ve karasuda bulunan her bir fenolik bileşen kendi arasında analize tabi tutulmuş olup pirina ve karasuda anlamlı farklılık bulunan fenolik bileşen çeşitleri * ile ifade edilmiştir.

p<0.05 student t test.

Çizelge 11. Pirina ve karasu ekstraktlarının nisbi bolluk cinsinden fenolik kompozisyonları

Bileşen Adı	Nisbi bolluk ± standart sapma (%)	
	Pirina	Karasu
(-)-Epicatechin	-	-
(+)-Catechin	0.02 ± 0	-

2,5-Dihydroxybenzoic acid	-	-
2-Hydroxycinnamic acid	-	-
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
3-Hydroxybenzoic acid	-	-
3-hydroxytyrosol	12.28 ± 0.14*	20.59 ± 0.1*
4-Hydroxybenzoic acid	1.37 ± 0.03*	1.97 ± 0
Apigenin 7-glucoside	5.83 ± 0.13*	4.26 ± 0.05*
Apigenin	3.19 ± 0.07*	0.11 ± 0.06*
Caffeic acid	6.72 ± 0.14	6.29 ± 0.46
Chlorogenic acid	0.26 ± 0.02*	0.74 ± 0.02*
Eriodictyol	0.02 ± 0	-
Ferulic acid	0.93 ± 0.01	0.96 ± 0.08
Gallic acid	-	-
Hesperidin	4.71 ± 0.02*	3.34 ± 0.1*
Homovanillic acid	0.84 ± 0.05	0.59 ± 0.07
Hyperoside	2.38 ± 0.11*	1.29 ± 0.15*
Kaempferol	0.23 ± 0.03	-
Luteolin 7-glucoside	13.24 ± 0.07*	16.54 ± 0.11*
Luteolin	21.46 ± 0.11*	7.89 ± 0.7*
Oleuropein	6.16 ± 0.14*	15.6 ± 0.01*
p-Coumaric acid	4.26 ± 0.05*	5.52 ± 0.16*
Pinoresinol	0.89 ± 0.2*	0.08 ± 0.03*
Protocatechuic acid	1.77 ± 0.06*	3.29 ± 0.04*
Pyrocatechol	0.15 ± 0.04	-
Quercetin	4.87 ± 0.08*	0.41 ± 0.24*
Rosmarinic acid	-	-
Sinapic acid	-	-
Syringic acid	-	-
Taxifolin	0.03 ± 0	-
Vanillic acid	3.32 ± 0.41*	7.89 ± 0.83*
Vanillin	0.45 ± 0.05	-
Verbascoside	4.59 ± 0.04*	2.6 ± 0.08*

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, çizelgedeki değerler $\text{ort} \pm \text{std}$ sapma değerini göstermektedir.

Pirina ve karasuda bulunan her bir fenolik bileşen kendi arasında analize tabi tutulmuş olup pirina ve karasuda anlamlı farklılık bulunan fenolik bileşen çeşitleri * ile ifade edilmiştir.

$p < 0.05$ student t test.

Pirinada bulunan ana fenolik bileşenler; luteolin, luteolin-7-glikozit, hidroksitirosol, apigenin-7-glikozit, kafeik asit ve oleuropein olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 11). Karasuda bulunan ana fenolik bileşikler ise; hidroksitirosol, luteolin-7-glikozit, oleuropein, luteolin ve kafeik asit olarak tespit edilmiştir. Fenolik bileşen karakterizasyonu sonucunda pirinada 26, karasuda ise 20 fenolik bileşen tanımlanmıştır. Pirinada baskın fenolik bileşen luteolin (458.65 ng/mg) iken, karasuda ise baskın fenolik bileşenin 3-hidroksitirosol (109.55 ng/mg) olduğu tespit edilmiştir. Pirinada tespit edilen vanilin, taksifolin, pirokateşol, kaempferol, eriyodiktiol ve kateşin karasuda tespit edilemediği görülmüştür. D'Antuono ve ark. tarafından 2014'te gerçekleştirilmiş olup, İtalyan ve Yunan zeytin çeşitlerinin karasuları 3 farklı membran teknolojisiyle (mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon) işlenmiş ve HPLC cihazı ile fenolik bileşenler karakterize edilmiştir. Karakterize edilen fenolik bileşenler arasında ana fenolik bileşen olarak hidroksitirosol tüm zeytin çeşitlerinde bulunmuştur. Ayrıca ultrafiltrasyon yöntemiyle elde edilen karasu örneklerinden LC/DAD/ESI-MS ile fenolik bileşenler karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon sonucunda birçoğu iz miktarda 23 farklı fenolik bileşen tespit etmişlerdir. Tespit ettikleri fenolik bileşenlerden bazıları; hidroksitirosol, tirosol, kafeik asit, kumarik asit, verbaskozit, isoverbaskozit, hidroksitirosol glikozit, rutin, quinik asit olduğu söylenebilir. (D'Antuono ve ark. 2014).

Literatür verileri incelendiğinde, Aggoun ve ark. 2015'te Cezayir'deki 3 farklı zeytin çeşidinde presleme ve 3 fazlı zeytinyağı üretimi sonrası elde ettikleri karasuların fenolik kompozisyonunu inceledikleri çalışmada fenolik bileşenlerin işlem yöntemi ve çeşide göre önemli oranda farklılıklar gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada tespit edilen fenolik bileşenlerden tirosolün 103.3-282.4 µg/ g DM, luteolinin 72.2-112.8 µg/ g DM, kafeik asidin 26.2-187.0 µg/ g DM ve oleuropeinin ise 6.4-2723.2 µg/ g DM aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen tirosol miktarının (109.5 µg/ g), Aggoun ve ark. (2015) tespit ettiği değer aralığında (103-282 µg/ g) olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada tespit edilen kafeik asit miktarı (33.4 µg/ g), Aggoun ve ark. (2015) tarafından bildirilen kafeik asit değer (26-187 µg/ g) aralığında bulunmaktadır. Diğer taraftan, bu tez çalışmasında tespit edilen luteolin miktarı (42.0 µg/ g) Aggoun ve ark. (2015) tarafından bildirilen luteolin miktar aralığından (72-112 µg/ g) düşük olduğu tespit edilmiştir. İlaveten Yorulmaz ve Tekin (2012) Gemlik çeşidi zeytinlerin ve bu varyeteden elde edilen zeytinyağların fenolik karakterizasyonlarını belirledikleri çalışmalarında Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve

Kuzey Ege'den temin edilmiş Gemlik zeytinlerinde tirosol miktarının 110.04-437.45 mg/kg, oleuropein miktarının 1038.89-5129.72 mg/kg, luteolin miktarının 57.78-388.26 mg/kg, verbascoside miktarının ise 132.25-242.05 mg/kg aralığında değiştiğini bulmuşlardır. Ekstraktlarımızda elde etmiş olduğumuz tirosol miktarı (pirina etanolik ekstraktında 262.4- $\mu\text{g/g}$; karasu etanolik ekstraktında 109.5 $\mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir. Elde edilmiş olan bu değer Yorulmaz ve ark. (2012)'nin rapor etmiş olduğu değerler ile örtüşmektedir (110.04-437.45 mg/kg). Benzer şekilde bu çalışmada ekstraktlardan elde edilmiş olan oleuropein miktarı (pirina etanolik ekstraktında 131.6 $\mu\text{g/g}$; karasu etanolik ekstraktında 82.9 $\mu\text{g/g}$) Yorulmaz ve ark. (2012)'nin bildirmiş olduğu oleuropein miktarından (1038.89-5129.72 mg/kg) düşük olduğu tespit edilmiştir. Karasu etanolik ekstraktımızdan elde ettiğimiz luteolin miktarı (42.0 $\mu\text{g/g}$) Yorulmaz ve ark. (2012)'nin rapor ettikleri değer aralığından düşük, Pirina etanolik ekstraktımızdan elde ettiğimiz luteolin miktarının ise (458.6 $\mu\text{g/g}$) yüksek olduğu görülmektedir. Ekstraktlarımızdan elde ettiğimiz verbascoside miktarı (pirina etanolik ekstraktında 98.0 $\mu\text{g/g}$, karasu etanolik ekstraktında 13.8 $\mu\text{g/g}$) Yorulmaz ve ark. (2012)'nin rapor ettikleri verbascoside miktarından (132.25-242.05) düşük bulunmuştur.

Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarından elde edilen fenolik bileşikler içerisinde, luteolin 7-glucosidase, apigenin-7, luteolin, hidroksitrosol, kafeik asit, hesperidin, oleuropein ve verbascoside baskın halde tespit edilmiştir. Bu 8 fenolik bileşenin toplam fenoliklerin pirinada ve karasuda sırasıyla %75 ve %77'lik kısmını oluşturmaktadır. Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının fenolik bileşen kompozisyonlarında önemli değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, oleuropein miktarı pirina etanolik ekstraktında %6 iken karasu etanolik ekstraktında bu oranın %15,6 olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun oleuropeinin suda daha fazla çözünebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Sanchez ve ark., 2007; Martinez-Navaro ve ark., 2021). Diğer taraftan, luteolin miktarı pirina etanolik ekstraktında daha fazla tespit edilmiştir. Bu durum, luteolinin suda çözünme yeteneğinin düşük olduğundan kaynaklanmış olabilir (Qing ve ark., 2017; Shakeel ve ark., 2018).

Pirina ve karasu fenolik bileşenleri üzerine gerçekleştirilmiş olan çalışmalar incelendiğinde, kompozisyon açısından çalışmalararasu farklılıklar olduğu söylenebilmektedir. Bu farklılık işleme tekniğine, meyvenin çeşit ve olgunluk

derecesine, farklı hasat yerlerine, ekstraksiyonda kullanılan solventlere ve solventlerin farklı polaritede olmalarına, çevre ve depolama şartlarına atfedilmekte olup (Fiorentino ve ark., 2003; Allouche ve ark., 2004; Piperidou ve ark., 2000; Obied ve ark., 2005; Aggoun ve ark., 2015), fenolik içeriğini etkileyen bir diğer faktör olarak ise ekstraksiyon işlemi gösterilmektedir, çünkü ekstraksiyon işlemi fenolik bileşiklerin ayrışmasını sağlayarak yağ ve atıkta bulunma miktarını direkt olarak etkilemektedir. Zeytinyağı üretiminde malakasyon sıcaklığı ve eklenen su miktarı da fenolik bileşen miktarını etkilemekte olduğu bildirilmiştir (Rodis ve ark. 2002; Obied ve ark. 2005).

4.1.5. ICP-MS ile mineral madde analiz

Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının mineral madde içerikleri ICP-MS ile analiz edilmiş olup, sonuçlar Çizelge 12’ de verilmiştir.

Çizelge 12. Pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının mineral madde içerikleri (ppm).

Bileşen Adı	MİKTAR±STD SAPMA (ppm)	
	Pirina	Karasu
Na	433.55±249.25*	12203.2±188.08*
Mg	236.87±4.15*	1242.65±225.96*
K	57121.06±3941.62	69513.33±5116.39
Ca	37.89±21.49	80.35±40.85
Mn	0.21±0.05*	4.05±0.36*
Fe	0.65±0.10*	70.40±12.89*
Ni	-	0.03±0.02
Cu	7.56±0.59	7.13±0.62
Zn	12.12±0.18	15.47±1.20
Cd	-	0.01±0.02

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, çizelgedeki değerler ort±std sapma değerini göstermektedir.

Pirina ve karasuda bulunan her bir mineral madde kendi arasında analize tabi tutulmuş olup pirina ve karasuda anlamlı farklılık bulunan mineral madde çeşitleri * ile ifade edilmiştir.

p<0.05 student t test.

Tanılgan ve ark. (2007)’nın 5 farklı Türk zeytin çeşitlerinin (Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye ve Ayvalık) fiziksel ve kimyasal kompozisyonunu belirledikleri çalışmada; zeytinlerin K, P, Ca, Na, Mg ve Fe minerallerince zengin olduklarını bildirmişlerdir. Özellikle Gemlik çeşidi zeytinlerin K, Na ve P mineral madde miktarları diğer çeşitlere göre daha yüksek bulduklarını rapor etmişlerdir. Çizelge 12’deki veriler incelendiğinde,

beklendiği gibi karasu ve pirina etanolik ekstraktlarında sodyum (Na) ve potasyum (K) minerallerinin baskın olduğu, diğer minerallerin ise iz miktarda bulunduğu görülmektedir. Ribeiro ve ark. 2020 de pirina tozlarının güvenliliğini araştırdıkları çalışmada ICP-OES ile mineral madde analizinde pirinada en yüksek K (potasyum) (54.31 g/kg kuru ağırlık) ve ikinci sırada P (fosfor) (4.76 g/kg kuru ağırlık) üçüncü sırada ise Mg (magnezyum) (1.53 g/kg kuru ağırlık); karasuda K, P ve Mg değerleri sırasıyla 17.56, 1.59, 0.50 g/kg kuru ağırlık olarak belirlemişler. Ribeiro ve ark. 2020 gerçekleştirdiği çalışmada belirttikleri pirinada K miktarı (54310 ppm) bizim pirinada elde ettiğimiz sonuçtan (57121ppm) düşük; Mg miktarı ise (1530 ppm) bizim elde ettiğimiz (236ppm) değerden yaklaşık 6.5 kat yüksektir. Karasuda elde ettikleri K miktarı (17560ppm) bizim karasu etanolik ekstraktından elde ettiğimiz miktardan (69513 ppm) yaklaşık 4 kat daha düşük; elde ettikleri Mg miktarı (500 ppm) ise bizim elde ettiğimiz miktardan (1241 ppm) yaklaşık 2.5 kat daha düşüktür.

Literatürde verilen zeytin minerallerinin araştırıldığı çalışmalarda zeytinde bulunan mineral madde miktarlarının zeytin çeşidine, olgunluk derecesine (Kiritsakis ve ark. 1998) bağlı olduğu ve işleme yöntemlerine göre değişiklik olduğu rapor edilmiştir (Lopez ve ark., 2008). Dolayısıyla bu çalışmada pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının mineral içeriklerinin literatürdeki bazı çalışmalar ile farklılık göstermesi, farklı çalışmalarda kullanılan farklı ekstraksiyon yöntemlerine ve farklı zeytin çeşitlerine atfedilebilmektedir.

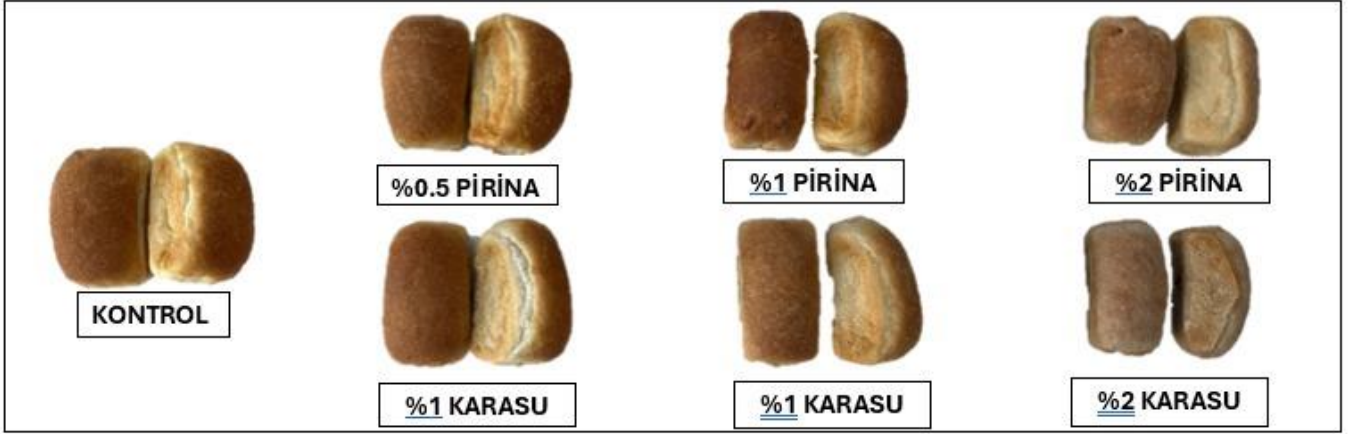
4.2. Pirina ve Karasu Etanolik Ekstraktlarını İçeren Fonksiyonel Ekmek Üretimi

Zeytin yağı endüstrisi artık ve atık ürünleri olan pirina ve karasudan elde edilen etanolik ekstraktların fırıncılık endüstrisinde fonksiyonel bir ingrediyen olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması maksadıyla, elde edilen ekstraktlar farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %2) ekmek formülasyonuna dahil edilmiş ve ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 18). Literatür verileri incelendiğinde meyvelerden yalnızca zeytinde bulunduğu bildirilen (Susamcı ve ark., 2011) fenolik bileşen olan oleuropeinin, zeytine özgü karakteristik acı tadını verdiği bildirilmiştir (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Bu sebepten dolayı, üretilen ekmeklerin teknolojik özelliklerinin belirlenmesi öncesinde, farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %2) fenolik bileşen içeren ekmek örnekleri (ön deneme maksadıyla) duyu analize tabi tutulmuş (bölüm 4.2.1.) ve duyu açıdan kabul edilebilir oranlar (genel kabul edilebilirlik puanları >5 olan örnekler) belirlenmiştir. Akabinde, duyu açıdan kabul edilebilir düzeyde olan ekmek örnekleri tekrardan

üretilep, teknolojik ve besinsel değerdendirilmeleri geręekleřtirilmiřtir (bölüm 4.2.2). Çalışma boyunca herhangi bir ekstrakt içermeyen ekmek kontrol olarak kullanılmıştır.

4.2.1 Farklı oranlarda ekstrakt içeren ekmek örneklerinin duyuusal analizleri (ön deneme)

Duyuusal özellikler tüm besinlerde olduğu gibi ekmekte de önemli bir kalite kriteridir ve insanların 5 duyu organına hitap edip kayıt altına alınmakta bilinç altına işlenmektedir (Callejo, 2011). %0.5, %1 ve %2 oranlarında ayrı ayrı karasu ve pirina içeren ekmek örnekleri (şekil 16 ve şekil 17) 20 panelistle duyuusal analize tabi tutulmuştur. Duyusal analizde panelistlere fenolik bileşen katkılı ve kontrol ekmeğini kabuk görünümu, gözenek, ekmek i rengi, koku, tat/aroma, çiğnenebilirlik ve genel kabul edilebilirlik bakımından 10 puan üzerinden değerdendirilmesi istenmiştir.



şekil 16. Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilavesiyle üretilen ekmek örneklerinin dış görünüşü



Şekil 17. Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilavesiyle üretilen ekmek örneklerinin iç görünüşü

Kabuk görünümü parametresine bakıldığında %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanları sırasıyla; 8.0, 5.8 ve 5.5; %0.5, %1 ve %2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanları sırasıyla; 7.6, 6.5 ve 3.7 olarak tespit edilmiş olup, bu değerlerin kontrol örneğinin almış olduğu duyuşal kabuk görünümü puanından (8.7) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 18). Genel olarak bakıldığında kabuk görünümü parametresinin etanolik ekstrakt miktarı arttıkça ekmek örneklerinde beğeni puanının düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 18). En düşük konsantrasyondaki (%0.5) pirina etanolik ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinin kabuk görünümü parametresinin (8.03) kontrol ekmeğine yakın bir puan (8.68) aldığı ve bu değerlerin arasında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin gözenek yapısı açısından değerlendirildiğinde, %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanları sırasıyla 7.1, 5.3 ve 6.5; %0.5, %1 ve %2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanları sırasıyla; 6.2, 5.9 ve 6.2 olarak tespit edilmiş olup, bu değerlerin kontrol ekmek örneğinin almış olduğu duyuşal gözenek yapısı puanından (8.5) daha düşük olduğu belirlenmiştir. En düşük puanı %1 pirina ve %1 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örnekleri sırasıyla 5.3 ve 5.9 olarak tespit edilmiş olup, kontrol ekmeğinin puanına (8.5) en yakın puanı %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek

örneği (7.1) almıştır. Kontrol ekmek örneği ve %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında, gözenek yapısı açısından, istatistiksel olarak önemli ($p>0.05$) bir fark gözlemlenmemiş olup, diğer ekmek örneklerinin kontrol ekmeğiyle arasında istatistiksel fark ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. İlave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça genel olarak ekmek örneklerinin gözenek boyutunun küçüldüğü ve daha sıkı bir ekmek görüntüsü elde edildiği tespit edilmiştir.

Sonuçlar iç renk parametresi açısından değerlendirildiğinde, %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli örneklerinin puanı sırasıyla; 7.8, 5.7 ve 4.8; %0.5, 1, 2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanı sırasıyla, 6.5, 5.3 ve 3.3 olarak tespit edilmiş olup, bu değerlerin kontrol ekmeğinin almış olduğu duyuşal iç renk puanından (8.7) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Kontrol ekmek örneği ve %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında iç renk parametresi açısından istatistiksel olarak önemli ($p>0.05$) bir fark gözlemlenmemiş olup, diğer ekmek örneklerinin kontrol ekmeğiyle arasında istatistiksel fark ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Hem pirina hem de karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde etanolik ekstrakt ilave miktarı arttıkça ekmek örneklerinin iç renk ve kabuk renginde önemli değişiklikler (daha siyah bir ürün üretilmesi) ve duyuşal parametre puanlarının düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum ekstrakte edilen pirina ve karasu etanolik tozlarının kendine özgü siyah-koyu renkte olmasına atfedilebilir. İlâveten, ekmek formülasyonuna dahil edilmiş olan etanolik ekstraktların sahip olmuş olduğu yüksek şeker içerikleri (pirinada %26.3 karasuda %31.4) ekmeğın pişirilmesi esnasında daha yüksek derecede Maillard reaksiyonu ve/veya karamelizasyon olayı gerçekleşmesine sebebiyet vermiş olabilir ve bu durum(lar) daha koyu renkli ekmek ürünü elde edilmesine sebebiyet vermiş olabilir, zira Maillard ve karamelizasyon olayları sonucu açığa çıkan bazı bileşenlerin son ürünün renk parametresinde koyulaşmaya sebebiyet olabildiği iyi bilinen bir gerçektir (Purlis, 2010).

Ekmek örnekleri koku parametresi açısından değerlendirildiğinde, %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli örneklerinin puanı sırasıyla; 6.4, 5.8 ve 4.8; %0.5, %1 ve %2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde ise sırasıyla; 6.4, 5.8 ve 4.8 olarak tespit edilmiş olup, bu değerin kontrol ekmeğinin almış olduğu duyuşal koku puanından (7.9) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Kontrol ekmek örneği ile %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği ve %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında koku parametresi açısından istatistiksel olarak önemli ($p>0.05$) bir fark gözlemlenmemiş olup, diğer ekmek örneklerinin kontrol ekmeğiyle arasında istatistiksel

fark ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Pirina ve karasu etanolik bileşen ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinin koku puanında ilave edilen etanolik ekstrakt (hem pirina hem de karasu) miktarı arttıkça düşüş söz konusudur.

Ekmek örneklerinin duyu analizi tat/aroma parametresi açısından değerlendirildiğinde %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli örneklerinin puanı sırasıyla 7.9, 6.7 ve 5.6; %0.5 %1 ve %2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin puanı sırasıyla 3.6, 2.9 ve 1.6 olarak tespit edilmiş olup, bu değerlerin kontrol ekmeğinin almış olduğu tat/aroma puanından (8.6) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Kontrol ekmek örneği ve %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında tat/aroma parametresi açısından istatistiksel olarak önemli ($p>0.05$) bir fark gözlemlenmemiş olup, diğer ekmek örneklerinin kontrol ekmeğiyle arasında istatistiksel fark ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Pirina etanolik ekstraktı ilaveli ekmek örnekleri miktar arttıkça tat aroma parametresinde azalma söz konusudur, ancak bu azalmanın kabul edilebilir değerler arasında olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, karasu etanolik ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinde miktar arttıkça önemli derecede bir düşüş söz konusu olup, tatta acılık/burukluk artışı olduğu görülmüştür. Bu sebeple tat/aroma parametresi karasu fenolik ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinde oldukça düşük puanlar almıştır. Karasu ve pirina etanolik ekstraktları ilavesi sonucu ekmek örneklerinin tat/aroma parametresinde gözlemlenen farklılıklar sahip olmuş oldukları farklı fenolik kompozisyonlara, özellikle farklı oleuropein miktarlarına atfedilebilir, çünkü zeytinde oleuropeinin, ağızda acı ve buruk bir tat bırakmakta olduğu bildirilmiştir (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Oleuropein açısından incelendiğinde pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının sırasıyla 1316,38 ng/mL ve 829,82 ng/mL oleuropein içeriğine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 10). İlâveten, pirina ve karasu etanolik ekstraktlarında bulunan oleuropein nisbi bolluğu hesaplandığında bu değerlerin sırasıyla %6,16 ve %15,6 olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir ifade ile, karasu etanolik ekstraktları içerisindeki dominant fenolik bileşenlerden birisinin oleuropein olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

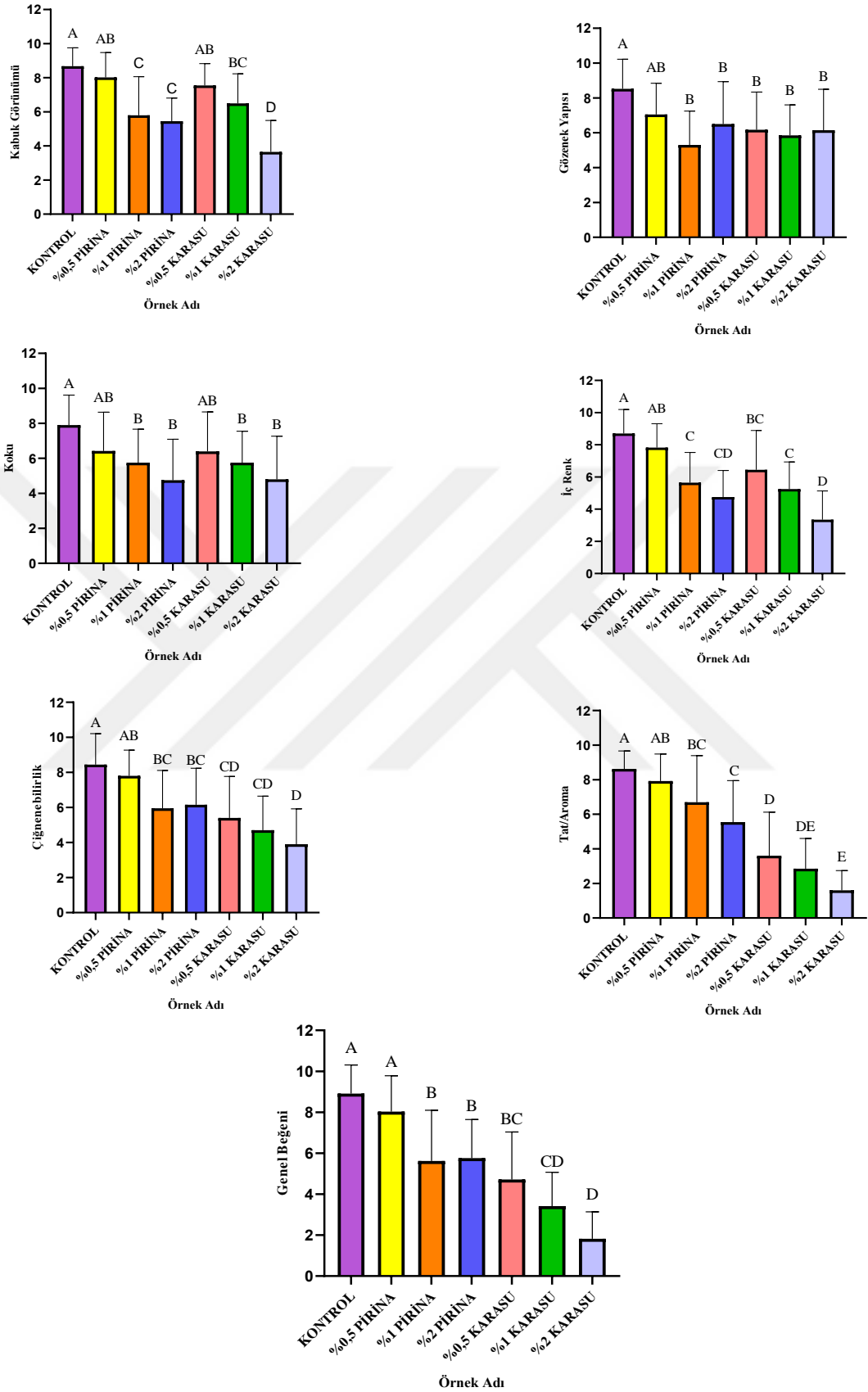
Çiğnenebilirlik parametresi açısından incelendiğinde %0.5, 1 ve 2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmeklerin puanlarının sırasıyla 7.8, 6.0 ve 6.2 olduğu; %0.5, %1 ve %2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde ise sırasıyla 5.4, 4.7 ve 3.9 olduğu belirlenmiş olup, bu değerlerin kontrol ekmeğinin almış olduğu çiğnenebilirlik puanından (8.5) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde düşüş olduğu görülmektedir (Şekil 18). En yüksek miktarda (%2) etanolik ekstrakt ilave edilmesiyle ekmek örneklerinde hacim azalması gözlemlenmiştir. Bu

hacim düşüşünün gözenek sıkılaşmasına sebep olduğu ve dolayısıyla çiğnenebilirliği olumsuz yönde etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

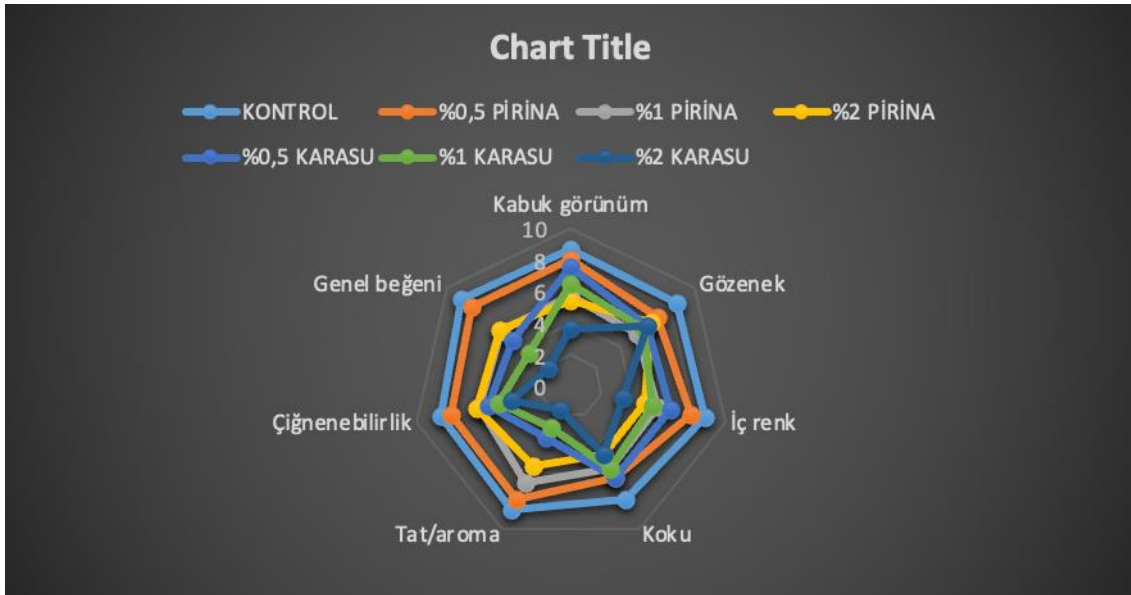
Ekmek örnekleri genel beğeni parametresi açısından değerlendirildiğinde ise %0.5, %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmeklerin puanlarının sırasıyla 8.0, 5.6 ve 5.8 olduğu; %0.5, 1 ve 2 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde ise sırasıyla 4.7, 3.4 ve 1.8 olduğu tespit edilmiş olup, bu değerlerin kontrol ekmeğinin almış olduğu genel beğeni puanından (8.9) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ekmek örneğine (8.9) en yakın genel beğeni puanının (8.0) %0.5 pirina etanolik ekstraktı ilaveli ekmeğin aldığı belirlenmiştir. En düşük genel kabul edilebilir puanını (1.8) ise %2 oranında karasu etanolik ekstraktı içeren ekmek örneklerinin aldığı tespit edilmiştir. Genel olarak karasu etanolik ekstraktlı ekmek örneklerinin genel beğeni puanlarının pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerine kıyasla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin, karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerine göre, tüketime daha uygun olduğu sonucuna ulaşılabilir. Bu seçimi etkileyen temel parametre karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmeklerin ağızda yoğun bir acı ve buruk bir tat bırakması olduğu söylenebilir.

Cecchi ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada pirinayı bazı ürünlere (ekmek, makarna ve granola) ilave etmişler ve duyuşsal profil ve tüketici beğenisi araştırmışlardır. Eklenen pirina ekmek örneklerinin iç renklerini etkilediğini kabuk rengini etkilemediğini çiğnenebilirliği ve acı-buruk tadın arttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Cedola ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, ekmek formülasyonuna pirina ve karasu ilave etmişler ve üretilen ekmek örneklerinin duyuşsal kalitesinin düştüğünü bildirmişlerdir. Literatürdeki bilgiler ekmek formülasyonuna zenginleştirme amacıyla eklenen bileşenlerin ekmeğin duyuşsal kalitesini önemli ölçüde etkilediğini ve hamurun gaz tutma kapasitesini düşürdüğünü göstermektedir (Hemdane ve ark., 2015; Saccotelli ve ark., 2017; Cedola ve ark. 2020).

Duyuşsal analiz sonucu genel beğeni skoru >5 olan ekmek örnekleri; %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek, %1 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek, %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek ve % 0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek olarak belirlenmiştir. Genel beğeni skoru kabul edilebilir seviyede olan bu ekmek örnekleri tekrar üretilerek, aşağıda detayları verilen reolojik ve teknolojik analizler açısından analiz edilmişlerdir.



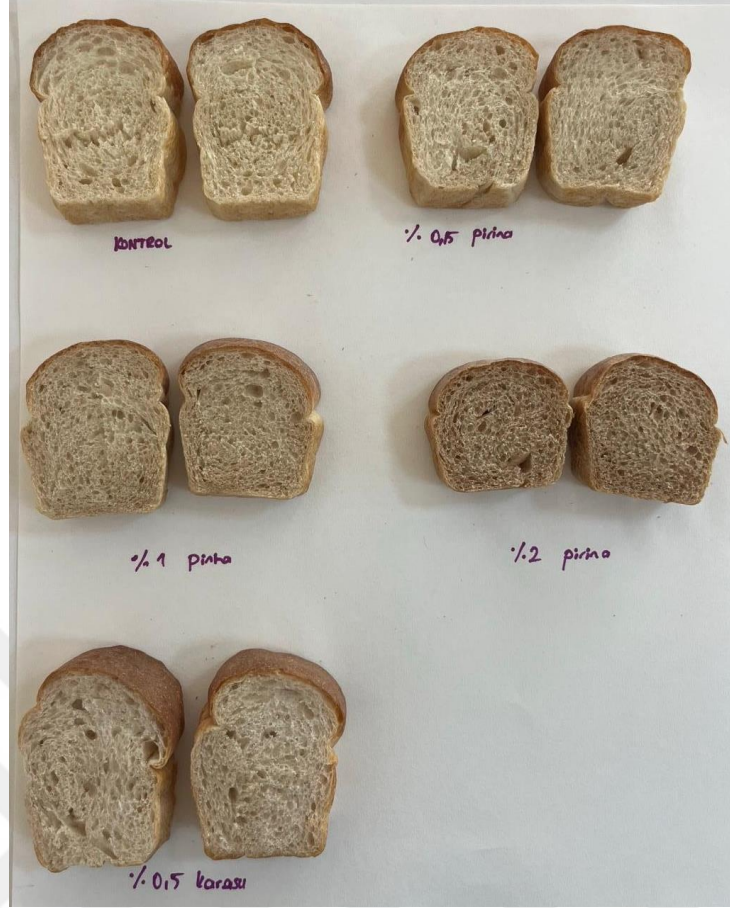
Şekil 18. Ön deneme amacıyla farklı oranlarda etanolik ekstrakt içeren ekmeğ örneklerinin duyu analizi sonuçları



Şekil 19. Ön deneme amacıyla farklı oranlarda etanolik ekstrakt içeren ekmek örneklerinin duyu analiz sonucunun örümcek ağı grafiği

4.2.2. Duyusal açıdan kabul edilebilir oranda etanolik ekstrakt içeren ekmek hamurlarının reolojik özellikleri

Ön deneme aşamasında (bölüm 4.2.1) duyu kabul edilebilirlik puanları >5 olan ekmek örneklerine (%0.5 pirina, %1 pirina, % 2 pirina ve %0.5 karasu etanolik ekstraktı içeren ekmek örnekleri (Şekil 20) ait hamurlar tekrar üretilmiş ve reolojik özellikleri (yapışkanlık, gerilme ve gevşeme özellikleri ve tekstür profil analiz değerleri) taze ve fermente edilmiş hamur örneklerinde test edilmiştir.



Şekil 20. Tekrar üretilen ekmek örneklerinin iç görünüşleri

Son ürünün teknolojik özelliklerinin belirlenmesinde hamurun yapısal özellikleri büyük etkiye sahiptir. Bu nedenle hamur reolojisi üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada kapsamında pirina ve karasu etanolik ekstraktlarının hamur reolojisi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu maksatla, hem fermentasyon öncesi hem de fermentasyon sonrasında hamur örneklerinin yapışkanlık, gerilme- gevşeme ve tekstür profil analizleri yapılmış ve sonuçlar Çizelge 13'te verilmiştir.

Yapışkanlık (Stickiness) değeri hamurun ekipman ve parmak gibi yüzeylere bıraktığı etki olarak tanımlanır. Yüksek yapışkanlık değeri hamur kuvvetini, ekmek hacmini ve hamur karıştırma toleransını etkileyerek hamur işleme ve ekmek kalitesini olumsuz etkilemektedir (Demirekin ve Gül, 2020). Çizelge 13 incelendiğinde, taze ve fermente hamur örneklerinin yapışkanlık değerleri sırası ile 17.55-40.23 g ve 24.09-42.52 g arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Kontrol hamur örnekleri fermentasyon öncesi ve sonrası en düşük hamur yapışkanlık özelliğini gösterirken, %2 oranında pirina etanolik ekstrakt kullanımı hem fermentasyon öncesi hem de fermentasyon sonrası

hamur örneklerinde en yüksek yapışkanlık değerinin ölçülmesine neden olmuştur. Fenolik bileşenlerin glutenin disülfür bağlarıyla reaksiyona girip bu bağları kırması sonucunda hamurun zayıflamasıyla sonuçlanması bu yapışkanlık artışının sebep olarak gösterilebilir (Han ve Koh 2011; Ananingsih ve Zhou 2012; Xu ve ark. 2019). Bununla birlikte %0.5 karasu etanolik ekstrakt kullanımı aynı oranda pirina etanolik ekstrakt kullanılan örneklerden daha düşük yapışkanlık değerleri göstermiş olup, karasu etanolik ekstrakt ilaveli taze ve fermente hamur örneklerinin yapışkanlık değerleri sırasıyla 29.64 g ve 30.18 g olarak ölçülmüştür. Hamur örneklerinin fermantasyon öncesi ve sonrası (30 C'de, %75-80 rutubette 2 saat) ortalama yapışkanlık değerleri sırasıyla 31.06 g ve 33.53 g olarak ölçülmüştür. Fermantasyon sonrası hamurların yapışkanlık değerlerinde bir artış gözlemlenmiştir. Formülasyonda yer alan bileşenlerden özellikle fırın mayası ve hamur ortamında bulunan bakteri ve maya kaynaklı enzimlerin fermantasyon koşullarında aktif olması, hamurun yumuşaklığının ve yapışkanlığının artmasından sorumlu olabilir. Benzer sonuçlar Kim ve ark. (2006), Lu ve ark. (2015), Pescador-Piedra ve ark. (2009) tarafından da gözlemlenmiş olup; hamur ortamına eklenen α -amilazın nişastanın dekstrinizasyona neden olması ile hamur stabilitesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bu değişiklikler hamuru daha zayıf ve yapışkan hale getirebilmektedir (Shafisoltani ve ark., 2014).

Hamur örneklerinde yapılan gevşeme-gerilme analiz sonuçlarına göre; fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası değerler sırasıyla 8.28-16.07g ile 6.71-7-51 g arasında değişiklik göstermiştir. Kontrol hamur örneğinin gerilme-gevşeme değeri, etanolik ekstrakt ilaveli hamur örneklerine kıyasla, daha düşük bulunmuştur. Fermantasyon öncesi taze hamur örneklerinin gerilme- gevşeme değerleri karşılaştırıldığında etanolik ekstrakt içeren hamur örneklerinin gevşeme gerilme değerleri sayısal olarak daha yüksek bulunmuş olup, %1 pirina içeren örnekler kontrol örneğinden istatistiksel olarak ($p<0.05$) daha yüksek gevşeme-gerilme özelliği göstermiştir. Patel ve Chakrabarti-Bell (2013) gerilme- gevşeme süresinin uzun olmasının hamurun elastik ve toparlanma kabiliyetinin yüksek olduğunu ve öncelikle ekmek yapımında kullanılmaya uygun olduğunu ifade etmişlerdir. Fermantasyon sonrası hamur örneklerinin gerilme- gevşeme değerleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) tespit edilememiştir. Hamur örneklerinin fermantasyon öncesi ve sonrası ortalama gerilme-gevşeme değerleri sırası ile 11.63 g ve 7.16 g olarak ölçülmüş olup, fermantasyon sonrası hamurların gerilme- gevşeme değerinde azalma söz konusudur.

Bulgularımızın aksine, literatürde Chang ve ark. (2020) fermantasyon süreci boyunca gerilme-gevşeme süresinin önemli ölçüde değişmediğini bildirmiştir.

Hamur örneklerinin sertlik değerleri fermantasyon öncesi hamurda 783-1222 g arasında, fermentasyon sonrası hamur örneklerinde ise 873-1496 g arasında değişiklik göstermiştir. Taze ve fermantasyon sonrası etanolik ekstrakt içeren hamur örneklerinin sertlik değerleri kontrol hamur örneğinden daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Etanolik ekstrakt ilavesi hem taze hem de fermantasyon sonrası hamur örneklerinin sertlik değerinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Hamura eklenen fenolik bileşikler gluten ve nişasta ile etkileşime girerek hamurun reolojik özelliklerini etkiler. Han ve Koh (2011) hamura eklenen fenolik bileşiklerin gluten ve nişasta ile etkileşime girerek hamurun reolojik özelliklerini etkilediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, buğday unu hamuruna kafeik asit, ferulik asit, siringik asit ve gallik asit ilave etmişler ve bu fenolik asitlerin hamurun yoğurma süresini, yoğurmaya karşı toleransını ve hamurun uzamasına karşı maksimum direncinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum fenolik asitlerin glutenin disülfür bağlarıyla reaksiyona girmesi ve proteinlerin yüksek molekül ağırlığını azaltarak yeniden düzenlenmesine neden olmaları sonucu hamur özelliklerini etkilemesi ile açıklamışlardır. %0.5 karasu ilaveli hamur örneği %0.5 pirina içeren hamur örneği ile karşılaştırıldığında; fermantasyon öncesi karasu ilaveli örnek daha sert bir yapı gösterirken, fermantasyon sonrası aralarında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Sonuçlar fermantasyon öncesi ve sonrası olarak değerlendirildiğinde ise fermantasyonun hamurların ortalama sertlik değerleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Hamur özelliklerinin önemli bir parametresi olan yapışkanlık, genellikle yapışma sırasında gelişen maksimum çekme kuvveti olarak değerlendirilir (McCleary, 1986). Fermantasyon öncesi hamur örneklerinin yapışkanlık (adhesiveness) değerleri -239 – -164 arasında; fermantasyon sonrası hamur örneklerinin yapışkanlık değerleri ise -70 – -0.76) arasında değişiklik göstermiştir. Fermantasyon öncesi hamur örneklerinin yapışkanlık değerleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) tespit edilemezken; fermantasyon sonrası kontrol ve pirina ilaveli hamur örnekleri ile %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli hamur örneği arasında anlamlı fark ($p<0.05$) bulunmuştur. Fermantasyon öncesi ve sonrası ortalama yapışkanlık değerleri karşılaştırıldığında fermantasyon sonrası yapışkanlık değerinin arttığı belirlenmiştir.

Hamur formülasyonlarında pirina ve karasu etanolik ekstrakt kullanımı fermantasyon öncesi ve sonrası hamur örneklerinin elastikiyet değerlerini istatistiksel

olarak değiştirmezken ($p>0.05$), fermantasyon öncesi ortalama elastikiyet değeri fermantasyon sonrası ortalama elastikiyet değerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum fermantasyon sonrası gluten ağının zayıflamasının elastikiyeti azalması ile ilgili olabilir. Benzer sonuçlar Yue ve ark. (2019) tarafından bildirilmiş olup, fermantasyonun ardından hamurların elastikiyetinin azaldığını rapor etmişlerdir. Taze ve fermente hamur örneklerinin koheziflik değerleri sırasıyla 0.54-0.77 ve 0.49-0.58 arasında değişim göstermiştir. Fermantasyonun ardından hamur örneklerinin koheziflik değerli arasında anlamlı bir farklılık belirlenmezken ($p>0.05$), fermantasyon öncesi karasu ekstraktı içeren örneklerin daha düşük koheziflik değeri gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte taze hamur örneklerinin ortalama koheziflik değerleri (0.70), fermente hamur örneklerinin aynı değerinden (0.53) daha yüksek bulunmuştur.

Taze hamur örneklerinin sakızimsılık değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmakla birlikte, sayısal olarak en düşük değer %0.5 karasu ekstraktı içeren hamur örneklerinde (498.76), en yüksek değer ise %1 pirina ekstraktı içeren örneklerde (825.18) belirlenmiştir. Fermantasyon sonrası hamurların sakızimsılık değerleri arasında fark istatistiksel olarak da anlamlı ($p<0.05$) bulunmuş ve en düşük değer kontrol örneğinde, en yüksek değerler ise %0.5 ve %1 pirina ekstraktı içeren hamur örneklerinde belirlenmiştir.

Hamur örneklerinin fermantasyon öncesi ve sonrası esneklik değerleri sırası ile 0.10 ile 0.11 ve 0.11 ile 0.13 arasında değişmiştir. Fermantasyon öncesi hamurların ortalama esneklik değeri (0.11), fermantasyon sonrası ortalama esneklik değerinden (0.12) daha düşük bulunmuştur. Elastikiyet (Springiness), yüzdelik iyileşmeyi ve esneklik (resilience), iyileşme hızını gösterir (Armero ve Collar 1997).. Fermente hamurların esneklik değeri daha yüksek olup, bu esnekliklerinin daha düşük olması ile ilgili olabilir.

Çizelge 13. Hamur örneklerinin fermantasyon öncesi ve sonrası reolojik özellikleri

Factor	Örnek	n	Stickiness (g)	Stress relaxation time (s)	Hardness (g)	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Resilience
Fermantasyon öncesi	Kontrol	4	17,55±0,45d	8,28±0,00b	783,57±16,25d	-223,38±54,70a	0,94±0,01a	0,76±0,05a	559,09±50,67a	0,11±0,00a
	1. Hamur	4	34,87±0,92b	9,08±1,17b	986,05±53,37c	-239,18±70,27a	0,95±0,01a	0,77±0,09a	720,51±48,21a	0,11±0,00a
	2. Hamur	4	33,04±2,45bc	16,07±2,37a	1222,27±51,50ab	-138,23±107,48a	0,89±0,11a	0,76±0,00a	825,18±75,34a	0,11±0,00a
	3. Hamur	4	40,23±0,33a	13,90±2,76ab	1073,98±101,21bc	-164,14±185,99a	0,76±0,29a	0,68±0,20ab	608,79±288,50a	0,10±0,00a
	4. Hamur	4	29,64±0,23c	10,83±361ab	1347,50±46,54a	-46,32±46,49a	0,65±0,41a	0,54±0,08b	494,76±12,27a	0,11±0,01a
Fermantasyon sonrası	Kontrol	4	24,09±0,57e	6,80±0,62a	873,64±14,00c	-0,76±0,48a	0,37±0,05a	0,49±0,02a	423,90±55,32c	0,12±0,00a
	1. Hamur	4	39,34±0,41b	7,42±0,38a	1323,86±84,43ab	-11,73±15,92a	0,46±0,08a	0,56±0,12a	793,20±62,28a	0,13±0,01a
	2. Hamur	4	34,01±0,37c	7,35±0,47a	1496,76±15,33a	-3,29±0,08a	0,39±0,00a	0,54±0,00a	808,28±15,38a	0,12±0,00a
	3. Hamur	4	42,52±0,23a	6,71±0,42a	1109,00±94,50b	-5,18±6,53a	0,27±0,14a	0,49±0,05	571,57±52,07b	0,11±0,00a
	4. Hamur	4	30,18±0,64d	7,51±0,37a	1302,67±95,38ab	-70,49±22,44b	0,38±0,15a	0,58±0,00a	753,21±54,90ab	0,12±0,02a
Fermantasyon										
	Fermantasyon öncesi	20	31,06±±4,75b	11,63±3,56a	1082,67±209,54a	-162,25±107,28b	0,84±0,21a	0,70±0,12a	733,96±141,57a	0,11±0,01b
	Fermantasyon sonrası	20	33,53±7,62a	7,16±0,49b	1221,19±575,32a	-18,29±29,33a	0,37±0,10b	0,53±0,06b	670,03±364,09a	0,12±0,01a

Analiz 4 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup veriler ort±std sapma olarak verilmiştir.

4.2.2.1. Fenolik bileşen ilaveli ekmek besinsel kompozisyonu

Farklı oranlarda pirina veya karasu fenolik ekstraktı ilave edilerek üretilen ekmek örneklerinin (Şekil 20) nem, kül, protein ve yağ içerikleri Çizelge 14'te verilmiştir.

Çizelge 14. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin besinsel kompozisyonu

	Nem (%)	Kül (%)	Protein (KM üzerinden)	Yağ (KM üzerinden)
Kontrol	38,20±0,43 A	1,27±0,01 AB	19,60±0,34 A	3,28±0,00 A
%0,5 pirina	37,81±0,37 A	1,09±0,01 AB	19,59±0,12 A	2,15±0,74 A
%1 pirina	37,33±2,16 A	1,01±0,04 B	19,48±0,89 A	2,39±0,16 A
%2 pirina	39,59±1,46 A	1,52±0,16 A	20,12±0,53 A	3,38±0,09 A
%0,5 karasu	36,31±2,53 A	1,26±0,20 AB	19,40±0,51 A	3,22±0,51 A

Her analiz 2 tekerrür olarak gerçekleştirilmiş olup veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p < 0.05$

Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstraktları içeren ekmek örneklerinin nem değerlerinin % 36.31-39.59 arasında değiştiği ve en yüksek nem içeriği değerine %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek (%39,59), en düşük nem değerine ise %0.5 karasu etanolik ekstrakt içeren ekmeğin (%36.31) olduğu görülmüştür. Ancak, ekmek örneklerinin nem içeriği değerlerinde gözlemlenen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Benzer şekilde etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin protein ve yağ içerikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) bir fark tespit edilmemiştir (Çizelge 14). Diğer taraftan, etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin kül miktarları %1.01-1.52 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 14). En yüksek kül içeriği %2 pirina etanolik ekstraktı ilave edilen ekmekte tespit edilmiştir. Etanolik ekstrakt ilavesiyle üretilen ekmek örneklerinden %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin kül içeriği (%1.52) ile % 1 pirina etanolik ekstrakt ilavesi ile üretilen ekmek örneğinin kül içeriği (%1.01) arasında istatistiksel olarak fark ($p < 0.05$) görülmektedir. Etanolik ekstrakt ilaveli diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark ($p > 0.05$) gözlemlenmemiştir. Etanolik ekstrakt ilave miktarı arttıkça ekmek örneklerinde kül miktarında artış görülmüştür. Bu artışın sebebi olarak ise elde edilen pirina ve karasu etanolik ekstrakt tozlarının içermiş olduğu kül değerleri (pirina; %4.55 karasu; %4.48) gösterilebilir.

4.2.2.2. Nişasta fraksiyonları ve glisemik indeks değerleri

Nişasta sindirilme hızına ve durumuna göre, hızlı sindirilebilir nişasta (HSN, tüketildikten 20 dakika içinde hidrolize olan), yavaş sindirilebilen nişasta (YSN, 20-120 dakika içinde hidrolize olan) ve son olarak dirençli nişasta (DN, 120 dakika içerisinde hidrolize olmaz) olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. (Englyst ve ark.1992; Dupuis ve Liu 2019). Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin sahip olmuş oldukları HSN, YSN ve DN sonuçları Çizelge 15’te verilmiştir.

Çizelge 15. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin Toplam nişasta ve nişasta fraksiyonları içeriği (%)

	Toplam Nişasta	HSN	YSN	DN
Kontrol	45.13±0.27B	31.95±0.14A	33.55±3.51A	34.50±3.65A
%0.5 Pirina	49.04±0.15A	38.58±2.27A	33.31±0.02A	28.11±2.29A
%1 Pirina	45.30±0.73B	33.34±3.57A	29.77±2.94A	36.89±0.63A
%2 Pirina	45.40±0.88B	32.62±4.83A	35.02±1.59A	32.37±3.24A
%0.5 Karasu	45.19±0.04B	35.09±2.18A	30.63±7.73A	34.28±5.56A
Ticari Ekmek	45.48±0.42B			

Analiz 2 tekrür olarak gerçekleştirilmiş olup veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir.

HSN: Hızlı sindirilen nişasta, YSN: yavaş sindirilen nişasta, DN: dirençli nişasta

Değişen miktarlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin toplam nişasta miktarları %45.13 ila %49.04 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Kontrol ekmek örneği ile %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) bulunmaktadır. Diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) görülmemiştir.

Cingöz ve ark. (2022) kepek ve ince kepeği ekmek formülasyonuna farklı oranlarda (%10, %20 ve %30) ilave ettikleri çalışmada toplam nişasta içeriklerini %31.85 ila 45.51 arasında değişen değerler olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerler bizim elde ettiğimiz toplam nişasta değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Farklı miktarlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde hızlı sindirilebilir nişasta (HSN) miktarı %31.95 ila %38.58 arasında değişmekte olduğu görülmektedir (Çizelge 14). Ekmek örneklerinin hızlı sindirilebilir nişasta miktarları arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) bulunmamıştır. İlave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça hızlı sindirilebilir nişasta miktarında düşüş söz konusudur, ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde Whitney ve Şimşek (2020), patates unu ilaveli (%5,

%10 ve %15) ekmek örneklerinde hızlı sindirilebilir nişasta miktarlarını %29 ila %38 arasında değen değerler bulduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Cingöz ve ark. (2022) farklı oranlarda kepek ve ince kepek ilave ettikleri ekmek örneklerinde hızlı sindirilebilir nişasta içeriklerinin %25.27 ila %37.39 arasına değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu değerler ile bizim elde ettiğimiz değerlerin yakın olduğu görülmektedir.

Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde yavaş sindirilebilir nişasta miktarı %29.77 ila %35.02 arasında değişiklik göstermiştir. Ekmek örnekleri arasında yavaş sindirilebilir nişasta miktarı açısından istatistiksel olarak bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir. İlave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça yavaş sindirilebilir nişasta miktarında kısmi bir artış görülmektedir, ancak gözlemlenen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Whitney ve Şimşek (2020) yapmış oldukları çalışmada patates unu ilaveli (%5, %10 ve %15) ekmek örneklerinin yavaş sindirilebilir nişasta miktarlarının %24 ila %27 arasında değişen değerler elde etmişlerdir. Bu değerler ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz YSN değerleri benzerlik göstermektedir. Cingöz ve ark. (2022) kepek ve ince kepek ilaveli ekmek örneklerinin yavaş sindirilebilir nişasta değerlerini %3.86 ila %7.58 arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında ürettiğimiz ekmek örneklerinin YSN miktarı yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum kullanılan kepeğin sahip olmuş olduğu fenolik veya antibesinsel bileşenlere atfedilebilir, zira bazı fenolik bileşenlerin nişasta ile etkileşime girerek, nişastanın enzimatik degradasyonunu azalttığı literatürde rapor edilmiştir (Ashwar ve ark., 2016). İlaveten hem fenolik bileşenlerin hem de kepekte bulunan bazı antibesinsel bileşenleri (fitik asit gibi) sindirim enzimlerinin faaliyetlerini olumsuz yönde etkileyerek nişasta sindirilebilirliğini azalttığı bilinmektedir (Thompson ve Yoon, 1984).

Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde dirençli nişasta miktarı %28.11 ila %36.89 arasında değiştiiği görülmektedir (Çizelge 15). Ekmek örnekleri arasında dirençli nişasta açısından istatistiksel olarak bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir. Genel olarak bakıldığında, ilave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça dirençli nişasta miktarının artışı söz konusudur, ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Whitney ve Şimşek (2020) yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri dirençli nişasta verileri %5 ila %11 arasında değiştiiğini bildirmişlerdir.

Pirina ve karasudan elde edilen fenolik ekstrakt ilavesi ile üretilen ekmek örneklerinin glisemik indeks değerleri Çizelge 16’da verilmiştir.

Çizelge 16. Ekmek örneklerinin *in vitro* glisemik indeks değerleri (%)

	Glisemik İndeks
Kontrol	96.16±0.04AB
%0.5 Pirina	111.57±4.52A
%1 Pirina	104.05±12.1AB
%2 Pirina	85.16±0.69B
%0.5 Karasu	90.16±0.04AB

Analiz 2 tekerrür olarak gerçekleştirilmiş olup veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p<0.05$.

Glisemik indeks, tüketilen karbonhidratlı besinlerin kandaki glukoz miktarına etkisi olarak açıklanabilir. Aynı miktarda karbonhidrat içeriğine sahip farklı yiyeceklerin (referans olarak genelde beyaz ekmek ya da glikoz kullanılmakta) tüketilmesini takip eden ikinci saatte kandaki glukoz miktarında meydana gelen değişimin ölçümüdür (Memiş ve Şanlıer, 2009).

Glisemik indeks sonuçları incelendiğinde en düşük glisemik indeks değerine %85.16 ile % 2 pirina fenolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği, en yüksek glisemik indeks değerine ise %111.57 ile %0.5 pirina fenolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin sahip olduğu tespit edilmiştir (çizelge 16). Kontrol ekmek örneğinde glisemik indeks değeri %96.16 olarak tespit edilmiştir. Yapılan glisemik indeks analizi sonucunda formülasyona ilave edilen pirina fenolik ekstrakt miktarı arttıkça glisemik indeks miktarında düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol ekmek örneği ile en düşük (%85.16) glisemik indeks değerine sahip ekmek örneklerinin (%2 pirina fenolik ekstrakt ilaveli ekmek) arasındaki fark % 11 olarak tespit edilmiştir. Bu doğrultuda pirina fenolik ekstrakt ilavesi ekmek örneklerinin glisemik indeks değerini %11 düşürdüğü gözlenmiştir. Ancak %0.5 ve %1 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin glisemik indeks değerleri kontrol ekmek örneğinin glisemik indeks değerinden yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durum, pirina etanolik ekstraktının içerdiği şeker miktarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu düşüncenin etanolik ekstraktlara uygulamış olduğumuz HPLC analiz sonuçlarımız ile (pirina toplam basit şeker %26.3) uyumlu olduğu görülmektedir (Çizelge 4). Bir

başka önemli nokta ise ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça glisemik indeks değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum, özellikle nişastanın amiloz kısmı ile fenolik bileşenlerin hidrofobik etkileşime girmeleriyle nişasta-fenolik etkilemiş oluşturmalarından kaynaklanmış olabilir. İlâveten, fenolik bileşenlerin amilaz enzimini kısmen inaktive etmesi sonucunda nişastanın glisemik indeksinde düşüşe sebep olmuş olabilir (Amoako ve Awika, 2019; Zhu, 2015).

4.2.2.3. Diyet lifi içerikleri

Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilave edilerek üretilen ekmeklerin suda çözünen, suda çözünmeyen ve toplam diyet lifi içerikleri gravimetrik yöntemle tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 17’de verilmiştir. Veriler incelendiğinde, örneklerin toplam diyet lifi içeriklerinin %4.45 ila %6.42 (ağırlık üzerinde) arasında değiştiği tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan incelendiğinde, %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin (%6.42) ile %1 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin toplam diyet lifi içeriklerinin (%4.43) istatistiksel olarak farklı olduğu ($p<0.05$), ancak diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) olmadığı gözlemlenmemiştir. Ekmek örneklerinin suda çözünen diyet lifi içerikleri %0.88 ila %2.19 arasında, suda çözünmeyen diyet lifi içerikleri ise %3.29 ila %4.22 arasında değiştiği tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan bakıldığında, ekmek örnekleri arasında hem suda çözünen diyet lifleri hem de suda çözünmeyen diyet lifleri bakımından herhangi bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Çizelge 17. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin suda çözünen, suda çözünmeyen ve toplam diyet lifi içerikleri

	Suda çözünen diyet lifi	Suda çözünmeyen diyet lifi	Toplam Diyet Lifi % w/w
Kontrol	1.79±1.55A	3.58±0.64A	5.36±0.91AB
%0,5 Pirina	2.19±0.19A	4.22±0.18A	6.42±0.01A
%1 Pirina	0.88±0.00A	3.55±0.02A	4.43±0.02B
%2 Pirina	1.77±0.00A	3.29±0.41A	5.07±0,41AB
%0,5 Karasu	1.87±0.27A	3.29±0.01A	5.16±0.28AB

Analiz 2 tekerrür olarak gerçekleştirilmiş olup veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p<0.05$

Literatür karşılaştırması amacıyla yapılan araştırması sırasında fenolik ekstrakt ilavesi ile üretilen ürünlerde diyet lifi analizi yapılan çalışmaya rastlanılmamış olup, elde ettiğimiz diyet lifi içerikleri literatür çalışmaları ile kıyaslanamamıştır.

4.2.2.4. Enerji (kalori) değerinin hesaplanması

Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin analizlere tabi tutulması sonucu elde edilen verilerle enerji değerleri (Yağ x 9) + (Protein x 4) + [(Karbonhidrat-Diyet Lif) x4] + (Diyet Lif x 2) formülü kullanılarak hesaplanmış olup, bu değerler Çizelge 18'de verilmiştir.

Çizelge 18. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin enerji değerleri

	Enerji (kcal)/100 g
Kontrol	247.77±3.55A
%0,5 Pirina	242.33±5.14A
%1 Pirina	249.72±7.95A
%2 Pirina	242.30±3.95A
%0,5 Karasu	255.51±8.94A

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir p<0.05

Etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin enerji değerlerinin 242-256 kcal/100 g arasında değiştiiği, ancak örnekler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı (p>0.05) tespit edilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde, pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilavesi ile üretilen herhangi bir ekmek örneğine rastlanılmamıştır. Diğer taraftan, fonksiyonel özelliklerini artırmak amacıyla farklı bileşen/ürün ilavesi ile üretilmiş ekmek örneklerine literatürde rastlanabilmektedir. Örneğin, Puric ve ark (2020), farklı oranlarda (%5 ve %20) elma çekirdeği posası ilavesi ile ekmek üretimi gerçekleştirmiş ve ürettikleri ekmek örneklerinin enerji değerlerinin 1014 - 1098 kJ/100 g (242.35 - 262.43 kcal/100 g) olarak belirlemişlerdir. İlaveten, Karaağaoğlu ve ark. (2008) Ankara ilinden temin edilen 33 ekmek üzerinde enerji değerlerini hesaplamışlardır. Çalışmada beyaz ekmek, tam buğday ekmeği, kepekli ekmek, yulaf ekmeği ve çavdar ekmeği kullanılmış ve enerji değerleri sırasıyla, 283.3, 274.7, 259.6, 290.3 ve 265.4 kcal/100 g olarak bildirmişlerdir. Bu değerlerin, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz enerji değerleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, pirina ve/ya karasu etanolik ekstrakt ilavesinin ekmek enerji değerini değiştirmediiği sonucuna varılabilmektedir.

4.2.2.5. Fenolik madde analiz sonucu

Karasu ve pirina etanolik ekstraktarı ile üretilen ekmeklerin fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi amacıyla fenolik madde içerikleri tespit edilmiş ve sonuçlar

serbest, bağı ve toplam fenolik madde içerikleri açısından aşağıda belirtildiği şekilde incelenmiştir.

4.2.2.5.1. Serbest fenolik madde analiz sonucu

Pirina ve karasudan ekstrakte edilen fenolik bileşen ilaveli ekme örneklerinin serbest fenolik madde miktarı Çizelge 18’de verilmiştir. Ekme örneklerinin serbest fenolik madde içerikleri 8388-10561 mgGAE/kg arasında değişiklik göstermektedir (Çizelge 19). %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneği en yüksek serbest fenolik madde içeriğine sahip ekme olduğu görülmektedir. Kontrol ekme örneği ile % 2 pirina ekstrakt ilaveli ekme örneği arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) bulunmaktadır. Diğer ekme örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) görülmemiştir. %2 pirina etanolik ekstraktı ilave edilmiş olan örneklerin, kontrole kıyasla %25 daha fazla fenolik madde içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç pirina etanolik ekstraktının ekme örneğinin fonksiyonel özelliğini artırmak amacıyla kullanılabilceği önerisinde bulunmaktadır.

Çizelge 19. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneklerinin kuru madde üzerinden serbest fenolik, bağı fenolik ve toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/kg)

Örnek	Serbest Fenolik	Bağı Fenolik	Toplam fenolik
Kontrol	8388,96±259.89B	424.07±1.83AB	8813,027±261,48 B
%0,5 pirina	9553,49±359.51AB	443.20±11.15AB	9984,251±369,56 AB
%1 pirina	9385,73±210.58AB	417.68±9.87B	9803,411±214,84 AB
%2 pirina	10561,30±174.18A	436.06±2.22A	10998,477±174,20 A
%0,5 karasu	8562,23±879.47AB	392.69±1.46C	8954,330±880,26 B

Analiz her bir örnek için 3 tekerrürlü yürütülmüş olup çizelgedeki veriler ort±std sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p<0.05$

4.2.2.5.2. Bağı fenolik madde analiz sonucu

Ekme örneklerinin bağı fenolik madde içerikleri 392.69- 443.20 mg GAE/kg arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 19). %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneği en yüksek bağı fenolik madde içeriğine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 18). Kontrol ekme örneği ile %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneğinin arasında istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) bulunmuş olup diğer ekme örnekleri arasında istatistiksel açıdan bir fark ($p>0.05$) görülmemiştir.

4.2.2.5.3. Toplam fenolik madde analiz sonucu

Ekmek örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri 8813.027-10998.477 mg GAE/kg arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 19). %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 19). İlave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça toplam fenolik madde miktarı da doğrusal olarak artış göstermiştir. Kontrol ekmek örneği ile % 2 pirina ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) bulunmaktadır. Diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) görülmemiştir.

Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin toplam fenolik madde analizi açısından karşılaştırılması sonucunda kontrol ekmek örneği ile %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel olarak önemli fark ($p<0.05$) bulunmaktadır. Diğer ekmek örneklerinin arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Cedola ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada pirina katkılı ekmekte 1.33 mg GAE/g; karasu katkılı ekmekte 0.49 mg GAE/g; karasu ve pirinanın birlikte eklendiği ekmekte ise 1.8 mg GAE/g değerine ulaşmışlardır. Cardinali ve ark. (2024)' siyah zeytin posasını farklı oranlarda (%10-15-20) ekmek formülasyonuna dahil etmişlerdir. Taze pirinadan yapılan ekmek örneklerinde sırasıyla, 0.70, 0.84 ve 0.91 mg GAE/g; pirinanın 6 ay buzdolabında bekledikten sonra ekmek formülasyonuna dahil edilmesiyle üretilen ekmek örneklerinde sırasıyla 1.08, 1.46 ve 1.70 mg GAE/g ve pirinanın 6 ay dondurulduktan sonra ekmek formülasyonuna dahil edilmesiyle üretilen ekmek örneklerinde sırasıyla 0.91, 1.01 ve 1.39 mg GAE/g Toplam fenolik madde elde etmişlerdir. Marinopoulou ve ark. (2020)' farklı oranlarda (%5,%10,%15) siyah ve yeşil zeytin posası ilaveli ekmeklerde Toplam fenolik madde analizi gerçekleştirmişlerdir. Siyah zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 67.0, 102.2 ve 114.1 mg GAE/100 g; yeşil zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 60.9, 89.7 ve 105.2 mg GAE/100 g değerini elde etmişlerdir. Bu çalışma dahilinde elde ettiğimiz değerler literatür verileri ile karşılaştırıldığında elde etmiş olduğumuz değerlerin genel olarak daha yüksek olduğu söylenebilir.

4.2.2.6. Antioksidan aktivite analizleri

Pirina ve karasu fenolik ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinin antioksidan içeriklerinin belirlenmesi amacıyla DPPH ve FRAP metotları kullanılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 20’de verilmiştir.

Çizelge 20. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin kuru madde üzerinden antioksidan içerikleri

	DPPH mg TE/kg	FRAP μ mol TE/g
Kontrol	173,76 \pm 52,53 D	1,7 \pm 0,18 D
%0,5 pirina	444,33 \pm 25,81 BC	3,54 \pm 0,20 C
%1 pirina	582,33 \pm 19,31 B	4,52 \pm 0,34 B
%2 pirina	986,79 \pm 4,37 A	6,77 \pm 0,53 A
%0,5 karasu	331,40 \pm 152,27 CD	2,75 \pm 0,16 C

Analiz her bir örnek için 3 tekerrürlü yürütülmüş olup çizelgedeki veriler ort \pm std sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p < 0.05$

DPPH analiz sonuçlarına göre fenolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin antioksidan aktivite değerleri 173.76-986.79 (μ mol TE/g) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 20). %2 pirina fenolik ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinin DPPH değerinin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Ekmek formülasyonuna ilave edilen fenolik ekstrakt miktarı arttıkça DPPH değeri de artmaktadır. Kontrol ekmek örneği ve %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında, DPPH açısından istatistik olarak önemli ($p > 0.05$) bir fark gözlemlenmemiş olup, diğer ekmek örnekleri ile kontrol ekmeği arasında istatistiksel fark ($p < 0.05$) tespit edilmiştir.

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesini artırdığı kabul edilmektedir (Zieliński ve Kozłowska, 2000). Ayrıca Yu ve Nanguet (2013)’ te antioksidan aktiviteyi olumlu etkileyen olaylardan bir diğerinin de Maillard reaksiyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Cardinali ve ark. (2024)’ siyah zeytin posasını farklı oranlarda (%10-15-20) ekmek formülasyonuna dahil etmişlerdir. Taze pirinadan yapılan ekmek örneklerinde 0.19-1.90 mg TEAC/g, 6 ay buzdolabında bekledikten sonra pirinadan yapılan ekmek örneklerinde 0.25-1.36 mg TEAC/g ve 6 ay dondurulduktan sonra pirinadan yapılan ekmek örneklerinde ise 0.25-1.07 mg TEAC/g aralığında bulduklarını bildirmişlerdir

Marinopoulou ve ark. (2020)’ farklı oranlarda (%5,%10,%15) siyah ve yeşil zeytin posası ilaveli ekmeklerde antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla DPPH metodunu kullanmışlardır. Siyah zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 20.7 - 43.7 ve

65.1 mgTE/100g, Yeşil zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 11.9- 21.2- 40.5 mgTE/100g değerlerini elde etmişlerdir.

Ekmek örneklerinin FRAP değerleri 1.7-6.77 ($\mu\text{mol TE/g}$) değerleri arasında değişim göstermiştir (Çizelge 20). Ekmek formülasyonuna ilave edilen fenolik ekstrakt miktarı arttıkça örneklerin FRAP değeri de artış göstermiştir. Fenolik ekstrakt ilavesi olmayan kontrol örneklerinde ortalama 1.7 $\mu\text{mol TE/g}$ olan FRAP değeri; en yüksek ekstrakt ilave miktarı olan %2 pirina ekstraktı ilaveli ekmek örneklerinde 6.77 $\mu\text{mol TE/g}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 20). Kontrol ekmek örneği ile diğer ekmekler arasında FRAP açısından istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

Cedola ve ark. (2020) nin pirina ve karasuyla zenginleştirmek amacıyla; spagetti ve ekmek formülasyonuna katmışlardır FRAP değerleri kontrol ekmeğinde 1.8 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$; % 10 oranında pirina katkılı ekmekte 17 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$; karasu katkılı ekmekte 5.6 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$; karasu ve pirinanın birlikte eklendiği ekmekte ise 25.3 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ değerine ulaşmışlardır (Cedola ve ark., 2020).

Cardinali ve ark. (2024) siyah zeytin posasını farklı oranlarda (%10-15-20) ekmek formülasyonuna dahil etmişlerdir. Taze pirinadan yapılan ekmek örneklerinde 0.14-1.76 mg TEAC/ g, 6 ay buzdolabında bekledikten sonra pirinadan yapılan ekmek örneklerinde 0.21-2.35 mg TEAC/ g ve 6 ay dondurulduktan sonra pirinadan yapılan ekmek örneklerinde ise 0.21-1.85 mg TEAC/ g aralığında bulunduğunu bildirmişlerdir.

Marinopoulou ve ark. (2020) farklı oranlarda (%5,%10,%15) siyah ve yeşil zeytin posası ilaveli ekmeklerde antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla FRAP metodunu kullanmışlardır. Siyah zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 60.9- 98.8- 148.7 mgTE/100g, yeşil zeytin posası ilaveli ekmek örneklerinde 45.5- 64.4 ve 88.4 mgTE/100g değerlerini elde etmişlerdir.

4.2.2.7. Ekmek ağırlık hacim spesifik hacim ve kabuk kalınlığı analiz

Tüketici tarafından ekmek kalitesinin belirlenmesinde ağırlık, hacim ve spesifik hacim büyük rol sahibidir. Pirina ve Karasu etanolik ekstrakt ilavesiyle üretilen ekmek örneklerinin ağırlık hacim spesifik hacim ve kabuk kalınlığı değerleri Çizelge 21’de verilmiştir.

Ekmek örneklerinin ağırlıkları, 65.73 g ile 69.12 g arasında değişim göstermiş, ortalaması 67.42 g olarak (Çizelge 21) belirlenmiştir. En yüksek ağırlık değeri 69,12 g ile %2 pirina ekstrakt ilaveli ekmek, en düşük ağırlık değeri ise 65.73 g ile %0.5 karasu ilaveli ekmek olmuştur. Ağırlık açısından kıyaslanan örneklerde, kontrol ekmek örneği

ile %0,5 karasu ilaveli ekmek arasında istatistiksel olarak önemli fark ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Marinopoulou ve ark. (2020) ekmek formülasyonuna farklı oranlarda (%5, %10 ve %20) siyah zeytin posası dahil ettikleri çalışmada ilave edilen posa miktarı arttıkça hacim değerlerinde doğrusal bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir.

İlave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça spesifik hacim değerlerinde düşüş söz konusudur. En yüksek spesifik hacim değerine %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği (7.61g/ml) onu sırasıyla; kontrol örneği (6.47 g/ml), %0.5 pirina etanolik ekstrakt (6.33 g/ml), %1 pirina etanolik ekstrakt (5.92 g/ml) ve % 2 pirina etanolik ekstrakt (4.63 g/ml) ilaveli ekmek örnekleri takip etmektedir. İlave edilen etanolik miktar ile spesifik hacim değerlerinin doğrusal olarak azalmasına pirina ekstraktının hamurda gluten ağlarını zayıflatması ile ilişkilendirilebilir. Antioksidan maddelerin protein ve/veya polisakkaritlerle kompleks oluşturma potansiyeli sebebiyle formülasyona biyoaktif bileşenlerin ilave edilmesiyle ekmek hamurunda gelişimi fiziksel olarak değiştirme yeteneğinin olduğu bilinmektedir (Sivam ve ark., 2010). Bu tür kompleksleşme reaksiyonları, fenolik bileşiklerin hidroksil grupları ile proteinlerin peptit kalıntılarının karbonil grubu arasındaki hidrojen bağlanması yoluyla tersine çevrilebilir şekilde meydana gelebilir ve ortaya çıkan kompleksler, fenolat ile anyon veya protein moleküllerinin katyonik bölgesi arasındaki kovalent ve iyonik bağlar yoluyla stabilize edilebilir. Kompleksleşme ayrıca polifenoller ve proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimler yoluyla veya farklı protein molekülleri ile çapraz bağlantı yoluyla da meydana gelebilir (Sivam ve ark. 2010). Ekmeğin hacmi; hamur reolojisi, kullanılan malzemelerin türü, mayalama süresi, yoğurma şartları ve sıcaklık gibi birçok faktöre bağlıdır (Arendt ve ark., 2007; Tolve ve ark., 2021). Ekmeğin zenginleştirilmesi amacıyla hamur formülasyonuna eklenen alternatif bileşenler genel olarak ekmeğin duyu kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir, çünkü gluten ağ oluşumunu ve gaz hücrelerini düzensizleştirir bu sebeple hamurun gaz tutma kapasitesi düşer (Hemdane ve ark. 2015; Saccotelli ve ark.2017; Cedola ve ark. 2020). Hamurda yeteri kadar gaz oluşmaması ve hamur elastikiyetinin az olması nedeniyle gluten proteinleri ekmeğin pişmesi sırasında yeterince genişemez ve istenilen kabarma meydana gelmez bunun sonucunda spesifik hacim değerlerinde önemli bir düşüşe sebebiyet verebilir. Bu bilgiler bizim elde ettiğimiz verileri destekler nitelikte olduğundan sonuçlarımız uyumludur.

Çizelge 21. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin teknolojik analiz sonuçları

	Ağırlık (g)	Hacim (ml)	Spesifik Hacim (g/ml)	Kabuk kalınlığı (mm)
Kontrol	67.98±0.49 AB	440.00±0.00 B	6.47±0.05 B	0.47±0.06 A
%0,5 pirina	67.56±0.47AB	427.50±10.61 B	6.33±0.20 BC	0.43±0.06 A
%1 pirina	66.72±0.11 BC	395.00±7.07 C	5.92±0.12 C	0.53±0.12 A
%2 pirina	69.12±0.49 A	320.00±0.00 D	4.63±0.03 D	0.57±0.06 A
%0,5 karasu	65.73±0.28 C	500.00±0.00 A	7.61±0.03 A	0.57±0.06 A

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü yürütülmüş olup çizelgedeki veriler ort±std sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan benzer olanlar aynı harfle belirtilmiştir. $p<0.05$

4.2.2.8. Ekmek kabuk ve iç renk analiz sonuçları

Bir gıdanın beğenilip beğenilmemesinde tüketici için en esas parametre yüzey rengi olmaktadır (Leon ve ark., 2006). Ekmek örneklerinde kabuk ve iç renk analizleri yapılmış sonuçlar Çizelge 22’de verilmiştir. L^* değeri; koyuluk- aydınlık, a^* değeri; kırmızılık-yeşillik b^* değeri ise sarılık-mavilik durumunu göstermektedir. Etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin kabuk L^* değerleri 49,73-54.43 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 22). En yüksek L^* değeri %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinde görülmüştür. Ekmek örneklerinin a^* değerleri 9.46 ile 12.53 arasında, b^* değerleri ise 18.52 ile 23.22 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 22). Kontrol ekmeğinin a^* değeri ile %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin arasında istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. İlave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça b^* değerinin azaldığı gözlemlenmektedir.

Etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin iç renk değerleri değerlendirmeye alındığında, L^* değerleri 57.4 ile 65.47 arasında değişiklik göstermiş olup, ilave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça L^* değerinde düşüş söz konusudur. Ekmek örnekleri arasında en düşük L^* değerine %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ekmek örneklerinin a^* değerleri (-1.01) ile 2.86 arasında değişiklik göstermiş olup, ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça a^* değerinde artış olduğu saptanmıştır. Kontrol ekmek örneği ile ekstrakt ilaveli ekmeklerinin a^* değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) bulunduğu gözlemlenmiştir. Ekmek örneklerinin iç renk b^* değerleri 11.80 ile 16.35 arasında değişiklik göstermiştir. Pirina etanolik ekstrakt ilavesi ile ekmek örneklerinin iç renk b^* değerleri artış göstermiştir (Çizelge 22).

Çizelge 22. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin kabuk ve iç renk sonuçları

Ekmek çeşitleri	Ekmek kabuk rengi			Ekmek iç rengi		
	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Kontrol	50.24±0.73 C	12.53±0.36 A	23.22±1.43 A	62.72±1.03 B	-1.01±0.11 D	13.57±0.86 B
%0,5 pirina	52.55±1.16 B	11.80±0.47AB	22.86±0.88AB	65.47±1.54 A	-0.34±0.17 C	13.56±1.01 B
%1 pirina	53.70±0.70 AB	10.74±0.90 ^B	20.96±2.52 ABC	62.46±0.94 B	0.72±0.21 B	14.40±0.97 B
%2 pirina	54.43±0.51 A	9.46±0.50 C	18.52±1.33 C	57.46±1.30 C	2.86±0.44 A	16.35±0.93A
%0,5 karasu	49.73±0.92 C	11.68±0.48 AB	19.99±1.51 BC	63.97±1.99 AB	0.31±0.27 B	11.80±0.84 C

* Aynı kolondaki farklı büyük harfler farklı konsantrasyonlarda kullanılan pirina ve karasu fenoliklerinin, ekmekler arasındaki anlamlı farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Cedola ve ark. (2020) ekmek formülasyonuna zeytin posası ekledikleri çalışmada, zeytin posası ilaveli ekmeklerin kontrol ekmek örneğine göre daha koyu renkli olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Cardinali ve ark. (2024) siyah zeytin posasının farklı oranlarda (%10, %15 ve %20) ekmek formülasyonuna dahil ettikleri çalışmada, ekmek kabuk renginde L^* parametresi ortalama değeri en düşük %20 posa içeren ekmek örneklerinde, a^* ve b^* değerlerinin ise en yüksek kontrol ekmek örneklerinde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Üretilen ekmeklerin iç renk ölçümlerinin L^* parametresinin ortalama değeri kontrol ekmek örneklerinde en yüksek, a^* ve b^* değerlerinin %20 posa ilaveli ekmek örneklerinde en yüksek değeri aldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz değerlerle kıyaslandığında, ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça ekmek örneklerinin iç renk L^* a^* ve b^* değerlerinde benzer artış ya da azalış söz konusudur. Ancak ekmek kabuk rengi değerlerinde tam tersi olduğu (iç renkte L^* değeri ekstrakt miktarı arttıkça düşerken; kabuk renginde miktar arttıkça artmaktadır) gözlemlenmektedir (Çizelge 22). Bunun sebebi olarak etanolik ekstraktın içermiş olduğu yüksek orandaki serbest şeker miktarı (pirina %26.3 ; karasu %31.4) gösterilebilir. Fenolik ekstrakt içerisinde bulunan şekerler ekmeklerin pişirme aşamasında meydana gelen maillard reaksiyonu sonucunda ekmek yüzeyinde esmerleşmeye neden olmaktadır (Jusoh ve ark., 2007). Şeker kompozisyonuna ek olarak etanolik ekstraktın ham renginin koyu renkli olması da ekmek örneklerinin rengini önemli ölçüde etkilemiştir.

4.2.2.9. Tekstür analiz sonuçları

Ekmek örneklerinin tekstürel analiz kapsamında 1. ve 3. gününde ölçüm yapılmış; sertlik, elastikiyet, kohesiflik esneklik ve çiğnenebilirlik değerleri belirlenmiştir. Tekstürel analiz sonuçları Çizelge 23'te verilmiştir.

Sertlik, duyusal anlamda, tüketen kişinin gıdayı ön dişleri arasında sıkıştırması için gereken güç olarak tanımlanmakta iken, tekstür cihazında ilk sıkıştırma esnasında grafikte oluşan maksimum pik kuvveti olarak tanımlanır (Gerçekaslan ve ark., 2007).

Ekmeğin iç kısım sertliği nişasta retrogradasyonu, gözenek yapısı, bayatlama sebebiyle suyun ekmeğe yüzeyine taşınması gibi birçok faktöre bağlıdır ve ekmekte duyuşal özellik olarak ekmeğin içi sertliği istenmemektedir (He ve Hosney, 1990; Baik ve Chinachoti, 2002, Cankurtaran-Kömürcü 2021).

Ekmeğin örneklerinin 1. gün sertlik verileri 257.84 g -735.72 g arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 23). Çizelge 23'te verilen tekstür profil analizi (TPA) sonuçlarına göre sertlik değeri en yüksek %2 pirina ekstrakt ilaveli ekmeğin örneklerinde (735.72 g) bulunmuştur. Kontrol ekmeğin örneği ile %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmeğin örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) tespit edilmiş olup, diğer ekmeğin örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir. Ayrıca ilave edilen fenolik ekstrakt miktarı arttıkça sertlik değeri artmıştır. Sertlik artışının sebebi fermentasyon sırasında oluşan gazın tutma kapasitesinin az olmasından kaynaklanabildiği ve en büyük sertliğin genelde ekmeğin hacminin en düşük olduğu ekmekte görüldüğü bildirilmiştir (Marinopoulou ve ark. 2020). Nitekim bizim yaptığımız ekmeğin örneklerinde de en düşük hacim (320 ml) en yüksek pirina ekstrakt ilaveli ekmekte (%2) ölçülmüş olup, sertlik değeri de (1.gün; 735.72 g; 3.gün 2632.27 g) en yüksek yine bu ekmeğin örneklerinde bulunmuş olmasıyla Marinopoulou ve ark. (2020) bildirdiğini destekler niteliktedir.

Ekmeğin örneklerine ait 3. gün sertlik değeri 1377.84 g ile 2632.27 g arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 23). En yüksek sertlik değeri %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmeğin örneklerinde rastlanmış olup, ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça ekmeğin örneklerinin sertlik değerlerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. 3. gün sertlik parametresinde Kontrol ekmeğin örneği ile %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmeğin örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p<0.05$) tespit edilmiş olup, diğer ekmeğin örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Sonuçlar ekmeğin örneklerinin depolama süresi açısından değerlendirildiğinde ise 1. günün ortalama sertlik değeri 389.46g, 3. günün ortalama sertlik değeri 1773.22g olarak belirlenmiş olup, depolama süresinin artması ekmeğin örneklerinin sertlik değerini önemli ölçüde artırmıştır. Bu durum depolama sonucu meydana gelen retrogradasyon olayına atfedilebilir.

Ekmeğin sertliği, kullanılan un bileşimi, formülasyonuna dahil edilen fenolik bileşenler, katkı maddeleri ve fermentasyon sürecinden etkilenebilmektedir. Buğday ununa fenolik bileşen ilavesi ile disülfid bağının tiyol grubuyla değişmesi sebebiyle, karıştırma süresi ve hamur direncini azalttığı bunun sonucuna üretilen ekmeklerin

sertliğini artırdığı bildirilmiştir. Hamur formülasyonuna eklenen fenolik bileşenler ve gluten arasında gerçekleşen reaksiyonlardan genellikle kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler sorumlu tutulmaktadır (Xu ve ark., 2019; Czajkowska–González ve ark., 2021). Ekmekteki sertlik, gluten ağının zayıflaması sonucunda fermentasyon esnasında oluşan gazı ekmek içerisinde yeterince tutamamasıyla ilişkilendirilebilir (Lomolino ve ark. 2017). Ayrıca fenolik bileşenlerin su rekabetleri sebebiyle nişastanın jelatinizasyon ve retrogradasyonunu da etkileyerek geciktirebilmektedir. Ekmek formülasyonuna zenginleştirmek amacıyla eklenen fenolik bileşenlerin yapısı, türü ve ekmeğin pişirilme şartları gibi değişkenlerin, hamur ve fenolik bileşenler arasındaki interaksiyonu etkileyebileceği düşünülmektedir (Xu ve ark., 2019).

Elastikiyet (Springiness) parametresi duyuşsal olarak ağızda azı dişleri tarafından sıkıştırılan besinin baskı ortadan kalktığında tekrar kendi yüksekliğine dönme hızı ve oranı olarak tanımlanmaktadır (Carr ve Tadinii, 2003; Gerçekaslan ve ark., 2007). Ekmek örneklerinde TPA sonuçlarında 1. gün elastikiyet parametresi değerlendirdiğinde 0.97 g ile 1.01 g arasında değişkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Ekmek örneklerinde 1. gün elastikiyet değerlerinde kontrol ekmeği ile %0.5 ve %1 pirina ilaveli ekmek örnekleri arasında istatistiksel olarak fark ($p < 0.05$) gözlemlenmiş olup, diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p > 0.05$) tespit edilememiştir.

Ekmek örneklerinin 3. gün elastikiyet değerleri 0.77g ile 0.90g arasında değiştiiği tespit edilmiştir. En yüksek elastikiyet değerine %1 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde rastlanmıştır. Ekmek örneklerinin 3.gün elastikiyet değerleri arasında istatistiksel olarak fark ($p > 0.05$) gözlemlenmemiştir.

Ekmek örneklerinin elastikiyet değerleri depolama açısından değerlendirildiğinde, 1. günün ortalama elastikiyet değeri 0.98g iken 3.günün ortalama elastikiyet değeri 0.85g olarak belirlenmiştir. Depolama süresinin artması ekmek örneklerinin elastikiyet değerinde düşüşe sebebiyet vermiştir.

Kohesiflik (Chosiveness) parametresi duyuşsal olarak azı dişler ile ısırılan örneğin kopmadan önceki deformasyon miktarı olarak tanımlanabilmektedir (Carr ve Tadinii, 2003; Gerçekaslan ve ark., 2007). Koheziflik kavramı ekmek yapısının iç direnci olarak ifade edilmiştir (Matos ve Rosell, 2012). Ekmek örneklerinin kohesiflik parametresinde 1. gün değerleri 0.71 g ile 0.77 g arasında değişkenlik göstermiştir. Ekmek formülasyonuna ilave edilen pirina etanolik ekstrakt ilavesi arttıkça ekmek örneklerinin kohesiflik değerlerinde azalma söz konusudur. En yüksek kohesiflik değeri

%0.5 pirina ilaveli ekmek örneklerinde tespit edilmiştir. Ekmek örneklerinin 1.gün kohesiflik değerleri arasında istatistiksel olarak fark ($p>0.05$) tespit edilmemiştir.

Ekmek örneklerinin kohesiflik parametresinde 3. gün değerleri 0.37 g ile 0.46 g arasında değişiklik göstermiştir. Ekmek örneklerinin 3.gün kohesiflik değerleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) bulunmamıştır. Ekmek örnekleri depolama açısından değerlendirildiğinde 1.günün ortalama kohesiflik değeri 0.75g olup, 3.günün ortalama koheziflik değeri 0.42g olarak tespit edilmiştir. Depolama süresi arttıkça ekmek örneklerinin koheziflik değerleri önemli ölçüde azalmıştır.

Sakızımsılık, sertlik ve koheziflik değerlerinin çarpılmasıyla elde edilen değer olarak tanımlanmaktadır (Gerçekaslan ve ark., 2007). Ekmek örneklerinin 1.gün sakızımsılık değerleri 194.91g ile 519.67 g arasında değişkenlik göstermiştir. En yüksek sakızımsılık değeri %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde tespit edilmiş olup, formülasyona ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça sakızımsılık değeri artış göstermiştir. Kontrol ekmek örneği ile %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) tespit edilmiş olup, kontrol ekmek örneği ve diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Ekmek örneklerinin 3.gün sakızımsılık değerleri 523.76g ile 955.11 g arasında değişiklik göstermiştir. Kontrol ekmek örneği ile %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) tespit edilmiş olup, kontrol ekmek örneği ve diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Çiğnenebilirlik (Chewiness) parametresi gıdanın yutmaya hazır hale gelene dek gereken çiğnenme sayısı ve bir saniye içinde gerçekleşen çiğneme sayısı ve çiğneme kuvveti olarak tanımlanabilmektedir (Carr ve Tadinii, 2003; Gerçekaslan ve ark., 2007). Sertlik, kohesiflik ve elastikiyet değerlerinin çarpımı çiğnenebilirlik değerini vermektedir. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin 1. gün çiğnenebilirlik değerlerinin 188.13 g ile 499.70 g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ekmek formülasyonuna ilave edilen pirina etanolik ekstrakt miktarı arttıkça çiğnenebilirlik değerlerinde de orantılı olarak artış gözlemlenmiştir. En yüksek çiğnenebilirlik değerine %2 pirina ilaveli ekmek örneğinde rastlanılmıştır. Kontrol ekmeği ile %1 ve %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örnekleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) tespit edilmiş olup, kontrol ekmeği ile diğer ekmek örnekleri arasında istatistiksel bir fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Ekmek örneklerinin 3.gün çignenebilirlik değerleri 471.40g ile 778.53g arasında değişiklik göstermiştir. Ekmekler arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) tespit edilememiştir. Ekmek örnekleri depolama açısından değerlendirildiğinde 1.günün ortalama çignenebilirlik değeri 281.91g, 3.günün ortalama çignenebilirlik değeri 611.08g olarak tespit edilmiştir. Depolama süresi arttıkça ekmek örneklerinin çignenebilirlik değerlerinde önemli ölçüde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

Ekmeğin iç esnekliği, sertliği ve ekmeğin taze iken dilimlenme yeteneği üzerinde ekmek yapımı esnasında oluşan gluten ağı etkilidir. İlaveten ekmeğin pişirme koşulları değişkenleri (sıcaklık süre gibi), lif içeriği, nişasta ve proteinin (gluten) zarar görüp görmemesi, hamur karıştırma aşamasında eklenen su miktarı gibi faktörler ekmeğin son tekstürünü etkilemektedir (Ndife ve ark., 2011;7 Akhtar ve ark., 2008; Cankurtaran-Kömürcü, 2021).

Esneklik, tekstür profil analizinde ilk sıkıştırma bitimi ile ardından gelen sıkıştırma başlangıcı arasındaki yükseklik farkı olarak belirtilen, geri gelme miktarının mm cinsinden belirlendiği parametre olarak belirtilmiştir (Gerçekaslan ve ark., 2007). Ekmek örneklerinin 1.gün esneklik değerleri 0.29g ile 0.34g arasında değişiklik göstermiştir. Kontrol ekmek örneği ile %1 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Ekmek örneklerinin 3.gün esneklik değerleri ise 0.10g ile 0.14g arasında değişkenlik göstermiştir. Ekmek örneklerinin 3.gün esneklik değerleri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) gözlemlenmemiştir.

Depolama süresi açısından değerlendirildiğinde 1.günün ortalama esneklik değeri 0.32g, 3.günün ortalama esneklik değeri ise 0.12g olarak belirlenmiştir. Depolama süresinin artması ekmek örneklerinin esneklik değerini önemli ölçüde azaltmıştır.

Çizelge 23. Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneklerinin tekstür analiz sonuçları

Depolama süresi (gün)	Örnek	Sertlik (g)	Elastikiyet (g)	Kohesiflik	Sakızımsılık	Çiğnenebilirlik	Esneklik
1. GÜN	Kontrol	296.66±8.18bc	0.970.01b	0.73±0.01ab	216.73±1.53c	210.29±0.79c	0.29±0.01b
	%0.5 Pirina	275.12±14.58c	1.00±0.00a	0.80±0.06a	219.12±26.65bc	220.25±27.55c	0.33±0.01ab
	%1 Pirina	381.98±34.78b	1.01±0.01a	0.77±0.00ab	288.96±25.65b	291.20±27.87b	0.34±0.01a
	%2 Pirina	735.72±90.86a	0.96±0.02b	0.71±0.00b	519.67±64.81a	499.70±51.49a	0.32±0.00ab
	%0.5 Karasu	257.84±10.51c	0.97±0.01b	0.76±0.02ab	194.91±2.47c	188.13±1.03c	0.31±0.03ab
3. GÜN	Kontrol	1377.84±110.48c	0.90±0.03a	0.38±0.07a	523.76±52.41c	471.40±31.62a	0.10±0.03a
	%0.5 Pirina	1405.35±157.62c	0.86±0.09a	0.43±0.07a	607.69±164.42bc	510.69±87.99a	0.13±0.02a
	%1 Pirina	2035.41±29.37b	0.87±0.06a	0.44±0.04a	892.99±74.84ab	778.53±114.35a	0.14±0.02a
	%2 Pirina	2632.27±464.61a	0.77±0.33a	0.37±0.06a	955.11±1.28a	734.66±311.44a	0.10±0.03a
	%0.5 Karasu	1415.23±334.58c	0.86±0.03a	0.46±0.05a	657.25±227.88abc	560.11±176.81a	0.13±0.02a
Depolama süresi (gün)	n	Sertlik (g)	Elastikiyet (g)	Kohesiflik	Sakızımsılık	Çiğnenebilirlik	Esneklik
1. gün	10	389.46±190.84b	0.98±0.02a	0.75±0.04a	287.88±129.06b	281.91±122.33b	0.32±0.02a
3. gün	10	1773.22±559.64a	0.85±0.12b	0.42±0.06b	727.36±202.02a	611.08±182.90a	0.12±0.02b

Analiz her bir örnek için 2 tekrerrürlü gerçekleştirilmiş olup, ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

4.2.2.10. Mikrobiyolojik analiz sonuçları

Ekmek formülasyonlarına farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilavesiyle üretilen ekmek örneklerinin küf ve maya oluşumuna olan etkilerinin incelenmesi amacıyla mikrobiyolojik ekim yapılmış ve maya sayım sonuçları Çizelge 24'te, küf sayım sonuçları ise Çizelge 25'te verilmiştir.

Ekmek örneklerinde maya oluşumu yalnızca %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinde 5. ve 6. gün ekiminde tespit edilmiştir. Diğer ekmek örneklerinde depolama süresi boyunca (6 gün) maya oluşumu gözlemlenmemiştir. Ekmek örneklerinde 3. ve 4.gün sayılan maya kolonileri arasında istatistiksel açıdan fark ($p>0.05$) bulunmamıştır. 5.gün maya sayımında kontrol ekmeğinde maya tespit edilememiş olup, kontrol ekmek örneği ile %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) bulunmuştur. 6. gün maya sayımı sonucunda kontrol ekmek örneği ile %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmekler arasında istatistiksel açıdan fark ($p<0.05$) bulunmuştur, diğer örnekler arasında fark ($p>0.05$) tespit edilmemiştir. Şekil 22 ve 23'te petri kaplarında oluşan maya-küf görselleri verilmiştir.

Çizelge 24. Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin mayalar üzerine antimikrobiyal etkisi (logkob/g)

MAYA	Kontrol	%0.5 Pirina	%1 Pirina	%2 Pirina	%0.5 Karasu
3.GÜN	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A
4.GÜN	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A
5.GÜN	0±0B	3.00±0.09A	0±0B	0±0B	0±0B
6.GÜN	0±0B	4.27±0.01A	0±0B	0±0B	0±0B

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, ortalama±std sapma olarak verilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0.005$) student t test

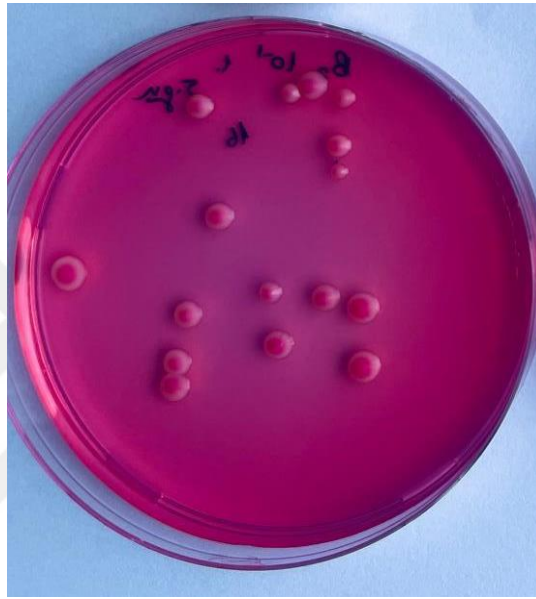
Değişen oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek ve kontrol ekmek örneklerinde depolama süresince 3. 4. ve 5. günde küf oluşumu gözlemlenmemiştir. Depolamanın son günü olan 6. günde ise yalnızca kontrol ekmek örneğinde küflenme (3.40 logkob/g) gözlemlenmiştir. Ekmek örneklerine farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilavesinin ekmeklerin depolama süresince küflenme üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan mikrobiyolojik ekim verilerine göre kontrol ekmek örneğine kıyasla küflenmeyi geciktirdiği sonucuna ulaşılabilmekte olup, bu durumun sebebi olarak fenolik bileşenlerin antifungal, antimikrobiyal özelliklerine atfedilebilir.

Çizelge 25. Farklı oranlarda pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneklerinin küfler üzerine antimikrobiyal etkisi (logkob/g)

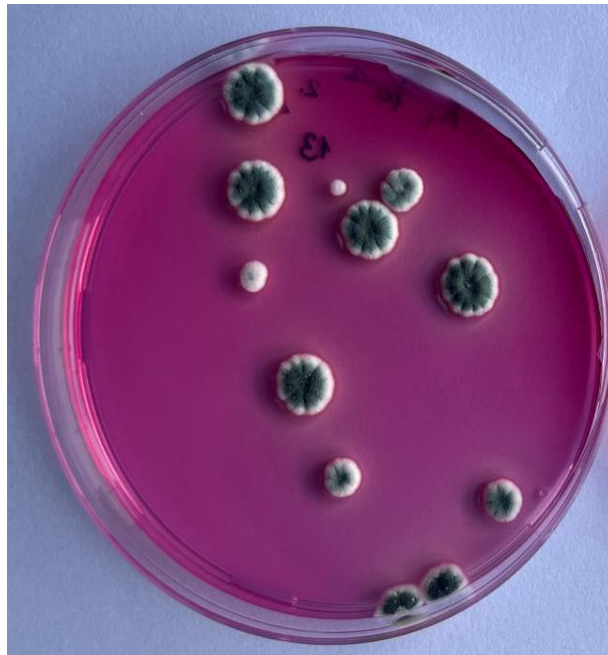
KÜF	Kontrol	%0.5 Pirina	%1 Pirina	%2 Pirina	%0.5 Karasu
3.GÜN	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A
4.GÜN	0±0 A	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A
5.GÜN	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A	0±0A
6.GÜN	3.40±0.01A	0±0A	0±0B	0±0A	0.00±0B

Analiz her bir örnek için 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

Aynı satırdaki farklı harfler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0.005$) student t test



Şekil 22. %0.5 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekme örneklerinin 5. gün mikrobiyolojik ekim petri kabı görseli



Şekil 23. Kontrol ekmeğinin 6. Gün mikrobiyolojik ekim petri kabı görseli

Galanakis ve ark. (2018) karasudan elde edilen fenolik bileşenleri ekmek formülasyonlarına farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri çalışmada ekmeklerin raf ömrünün %50 arttığını bildirmişlerdir. Fenolik bileşenlerin antioksidan etkilerinin yanında antimikrobiyal etkileri de bulunmaktadır. Gıdalarda mikrobiyal bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstererek ürünlerin raf ömrünü artırmaktadır (Galanakis ve ark., 2018).

Zeytin yaprağından fenolik bileşenlerin ekstrakte edilerek ekmek formülasyonuna farklı oranlarda (%1, %5, %10, %20 ve %40) dahil edilmesiyle yapılan bir çalışmada; olumlu sonuçlar elde edilmiş olup %10 ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin bile raf ömrünü 2 katına çıkardığı bildirilmiştir (Değirmencioğlu ve ark., 2011).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Çalışma kapsamında zeytinyağı üretimi esnasında artık ve atık ürün olarak ortaya çıkan pirina ve karasuda bulunan fenolik bileşiklerin elde edilmesi için en uygun ekstraksiyon yöntemi belirlenmiş olup, elde edilen fenolik ekstraktların (pirina ve karasu etanolik ekstraktları) besinsel içerikleri (protein, kül, yağ, basit şeker), fenolik karakterizasyonu, mineral madde içerikleri, bazı küf, maya ve bakterilere karşı antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir.

Pirina etanolik ekstraktının kül, protein ve toplam fenolik içeriklerinin sırasıyla %4,55, %2,55 ve %5,45 olduğu, diğer tarafta bu değerlerin karasu etanolik ekstraktı için sırasıyla %4,48, %1,57, ve %2,41 olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan karasu etanolik ekstraktının (%31.4), pirina etanolik ekstraktına kıyasla (%26,3), daha fazla miktarda basit şeker içerdiği belirlenmiştir. Sahip olmuş olduğu yüksek fenolik içeriği ile doğru orantılı olarak, pirina etanolik ekstraktının, karasu muadiline kıyasla, daha yüksek antioksidant kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. LC-MS/MS analizi sonucunda, pirina etanolik ekstraktında 26 adet, karasu etanolik ekstraktında ise 20 adet fenolik bileşiğe rastlanılmıştır. Pirina etanolik ekstraktında baskın fenolik bileşiğin luteolin (458.65 ng/mg), karasu etanolik ekstraktında ise 3-hidroksitrosol (109.55 ng/mg) olduğu tespit edilmiştir. Bazı maya, küf ve bakteriler üzerine antimikrobiyal etkilerini incelediğimiz analiz sonucunda (disk difüzyon ve kuyucuk yöntemi) her iki ekstraktında çalışmaya dahil edilen maya ve küfler üzerine herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı, çalışmaya dahil edilen bakteriler üzerine ise farklı düzeylerde antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. IPC-MS ile mineral madde içeriklerinin analizinde Na, Mg ve K mineralleri en yüksek miktarda belirlenmiş olup, pirina etanolik ekstraktına kıyasla, karasu etanolik ekstraktında daha fazla miktarda mineral madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Ekstraktların fırıncılık ürünlerinden olan ekmeğe formülasyonuna farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %2) ilave edilmesiyle ekmeğe üretilmiş, duyuşal açıdan genel beğeni puanı >5 olan ekmeğe örneklerinin besinsel, fiziksel, reolojik ve fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. Artan etanolik ekstrakt miktarına bağılı olarak ekmeğelerin duyuşal kalite parametrelerinde önemli bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Duyuşal açıdan optimum

kabul edilebilir ekmek örneklerinin %0.5, %1, %2 pirina etanolik ekstrakt ve %0.5 karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örnekleri olduğu belirlenmiştir.

Ekmek örneklerinde yapılan serbest fenolik madde analiz sonuçları 8388-10561 mgGAE/kg arasında değişen değerler almıştır. En yüksek serbest fenolik madde miktarı % 2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde tespit edilmiştir. Kontrol ekmeği ile %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneği arasında istatistiksel açıdan önemli fark ($p<0.05$) bulunmuştur. %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinin serbest fenolik içeriği kontrol ekmeğine kıyasla %25 daha fazla serbest fenolik madde içeriğine sahip olduğu, bu sonucun da ekmek formülasyonuna ilave edilmesiyle fonksiyonel ürün özelliğini artırma amacıyla kullanılabilceği sonucuna ulaşılabilmektedir.

Ekmek örneklerinin antioksidan kapasiteleri DPPH ve FRAP olmak üzere 2 farklı yöntemle belirlenmiştir. DPPH analizi sonuçları 173-986 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değişiklik göstermiş olup en yüksek DPPH miktarına %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde rastlanılmıştır. İlave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça DPPH değeri de artış göstermiştir. FRAP analiz sonuçları 1.7-6.77 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değiştiği, en yüksek FRAP değerine %2 pirina etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneğinde rastlanıldığı ve ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça FRAP değerlerinin de arttığı tespit edilmiştir.

Ekmek örneklerinin kabuk renk analizi sonuçlarında etanolik ekstrakt ilave miktarı arttıkça L^* değerlerinde artış, a^* ve b^* değerlerinde azalma iç renk değerlerinde ise L^* değerlerinde azalma, a^* ve b^* değerlerinde artış tespit edilmiştir.

Ekmek örneklerinin tekstür analiz sonuçları incelendiğinde ilave edilen etanolik ekstrakt miktarı arttıkça sertlik, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik parametrelerinde artış, kohesiflik değerinde ise azalış gözlemlenmiştir. Tekstür ekmek örneklerinin depolama süresi açısından değerlendirildiğinde ise tüm parametrelerin (sertlik, esneklik, kohesiflik, sakızimsılık, çiğnenebilirlik ve elastikiyet) ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

Pirina ve karasu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinin depolamaya bağlı olarak küf ve maya oluşumu tespit edilmesi amacıyla mikrobiyolojik ekim gerçekleştirilmiş olup, depolama süresince (6 gün) küf oluşumu etanolik ekstrakt ilaveli ekmek örneklerinde gözlemlenmemiş olup yalnızca kontrol ekmeğinde 6.günde tespit edilmiştir. Maya oluşumu ise yalnızca %0.5 pirina ilaveli ekmek örneklerinde 5. ve 6. günlerde tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar dahilinde fenolik bileşen ekstraktlarının antimikrobiyal etki göstermiş olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında yapılan analizler, zeytinyağı üretimi atıklarından elde edilen fenolik bileşen ekstraktlarının ekmek formülasyonuna dahil edilebileceğini sonucunu vermektedir. Yapılan duyu analizi sonucunda formülasyona dahil edilecek ekstrakt dozu pirinada %2 (çalışmada maksimum %2 denenmiş olup daha yüksek doz da denenebilir), karasuda ise maksimum %0.5 g olarak belirlenmiştir. Karasuda %0.5 g'ın üzerine çıkılması son üründe duyu olarak olumsuz sonuçlar doğurmaktadır.

5.2 Öneriler

Bu tez çalışması kapsamında zeytinyağı endüstrisi artık ve atık ürünleri olan pirina ve karasuda bulunan fenolik bileşenler etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların basit şeker konsantrasyonlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gelecek çalışmalar, düşük şeker içeriğine sahip pirina ve karasuda etanolik ekstraktlarının elde edilmesine odaklanmalıdır. İlave olarak, bu tez çalışması kapsamında elde edilen pirina ve karasuda etanolik ekstraktlarının fırıncılık endüstrisinde kullanılabilirlikleri ekmek model ürünü üzerinde analiz edilmiştir. Gelecek çalışmalar pirina ve karasuda etanolik ekstraktlarının diğer fırıncılık ürünlerinde ve diğer gıda endüstrisi ürünlerinin üretiminde fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanılabilirlikleri üzerine odaklanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- AACCI. 2000. Approved methods of the American Association of Analysis. 11th ed. AACC International, St. Paul, MN, USA.
- Abdel-Aal, E. S. M., and Rabalski, I., 2013, Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products, *Journal of Cereal science*, 57(3), 312-318.
- Abd-ElGhany, M. E., Ammar, M. S., and Hegazy, A. E., 2010, Use of olive waste cake extract as a natural antioxidant for improving the stability of heated sunflower oil, *World Applied Sciences Journal*, 11(1), 106-113.
- Aggoun, M., Arhab, R., Cornu, A., Portelli, J., Barkat, M., and Graulet, B., 2016, Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process, *Food chemistry*, 209, 72-80.
- Akhtar, S., Anjum, F. M., and Anjum, M. A., 2011, Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies, *Food Research International*, 44(3), 652-659.
- Aliakbarian, B., Casale, M., Paini, M., Casazza, A. A., Lanteri, S., and Perego, P., 2015, Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy, *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 376-383.
- Allouche, N., Fki, I., and Sayadi, S., 2004, Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 267-273.
- Alu'datt, M. H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A. R., and Rababah, T., 2010, Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake, *Food Chemistry*, 123(1), 117-122.
- Amoako, D. B., and Awika, J. M., 2016, Polymeric tannins significantly alter properties and in vitro digestibility of partially gelatinized intact starch granule, *Food Chemistry*, 208, 10-17.
- Amoako, D. B., and Awika, J. M., 2019, Resistant starch formation through intrahelical V-complexes between polymeric proanthocyanidins and amylose, *Food chemistry*, 285, 326-333.
- Ananingsih, V. K., and Zhou, W., 2011, Effects of green tea extract on large-deformation rheological properties of steamed bread dough and some quality attributes of steamed bread. In *11th International Congress on Engineering and Food "Food Process Engineering in a Changing World"*, National Technical University of Athens.
- Andreou, V., Psarianos, M., Dimopoulos, G., Tsimogiannis, D., and Taoukis, P., 2020, Effect of pulsed electric fields and high pressure on improved recovery of

high-added-value compounds from olive pomace, *Journal of food science*, 85(5), 1500-1512.

- Anonim (2024). Organik Atıklar. <https://www.sifiratik.gov.tr/organik-atik> (Erişim tarihi:03.10.2024).
- Arendt, E. K., Ryan, L. A., and Dal Bello, F., 2007, Impact of sourdough on the texture of bread, *Food microbiology*, 24(2), 165-174.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., and Masoodi, F. A., 2016, Preparation, health benefits and applications of resistant starch—A review, *Starch-Stärke*, 68(3-4), 287-301.
- Baik, M. Y., and Chinachoti, P., 2002, Effects of glycerol and moisture redistribution on mechanical properties of white bread, *Cereal chemistry*, 79(3), 376-382.
- Balzan, S., Taticchi, A., Cardazzo, B., Urbani, S., Servili, M., Di Lecce, G., ... and Fasolato, L., 2017, Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives, *LWT-Food Science and Technology*, 85, 89-95.
- Barcenas, M. E., Altamirano-Fortoul, R., and Rosell, C. M., 2010, Effect of high pressure processing on wheat dough and bread characteristics, *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 12-19.
- Barros, F., Awika, J. M., and Rooney, L. W., 2012, Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on in vitro starch digestibility, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(46), 11609-11617.
- Başar, Ş., and Karaoğlu, M. M., 2021, The effects of *Cephalaria syriaca* flour on physical, rheological and textural properties of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged wheat dough and bread, *Journal of Cereal Science*, 99, 103215.
- Baysan, U., Koç, M., Güngör, A., and Ertekin, F., 2023, 2-fazlı pirinanın ön kurutulmasının gerekliliği ve valsli kurutucu kullanımı. *Gıda*, 48(3), 562-574.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., and Sapirstein, H. D., 2005, Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions, *Cereal chemistry*, 82(4), 390-393.
- Bianchi, F., Tolve, R., Rainero, G., Bordiga, M., Brennan, C. S., and Simonato, B., 2021, Technological, nutritional and sensory properties of pasta fortified with agro-industrial by-products: a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4356-4366.
- Boskou D 1996, Olive oil chemistry and technology. AOCS Press, Champaign, IL, pp 52–83.

- Callejo, M. J., 2011, Present situation on the descriptive sensory analysis of bread, *Journal of Sensory Studies*, 26(4), 255-268.
- Cankurtaran-Kömürcü, T. 2021, çimlendirilmiş bazı ilkel buğdayların fonksiyonel özellikleri ile erişte ve ekmek üretiminde kullanılabilirliklerinin araştırılması, Doktora Tezi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.
- Cankurtaran-Kömürcü, T., and Bilgiçli, N., 2023, Utilization of germinated ancient wheat (Emmer and Einkorn) flours to improve functional and nutritional properties of bread, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 84, 103292.
- Cardinali, F., Belleggia, L., Reale, A., Cirlini, M., Boscaino, F., Di Renzo, T., ... and Aquilanti, L., 2024, Exploitation of Black Olive (*Olea europaea* L. cv. Piantone di Mogliano) Pomace for the Production of High-Value Bread, *Foods*, 13(3), 460.
- Carr, L. G., and Tadini, C. C., 2003, Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread, *LWT-Food Science and Technology*, 36(6), 609-614.
- Cecchi, L., Schuster, N., Flynn, D., Bechtel, R., Bellumori, M., Innocenti, M., ... and Guinard, J. X., 2019, Sensory profiling and consumer acceptance of pasta, bread, and granola bar fortified with dried olive pomace (pâté): A byproduct from virgin olive oil production, *Journal of food science*, 84(10), 2995-3008.
- Cedola, A., Cardinali, A., D'Antuono, I., Conte, A., and Del Nobile, M. A., 2020, Cereal foods fortified with by-products from the olive oil industry, *Food Bioscience*, 33, 100490.
- Cedola, A., Cardinali, A., Del Nobile, M. A., and Conte, A., 2017, Fish burger enriched by olive oil industrial by-product, *Food Science & Nutrition*, 5(4), 837-844.
- Cedola, A., Cardinali, A., Del Nobile, M. A., and Conte, A., 2019, Enrichment of bread with olive oil industrial by-product, *J. Agric. Sci. Technol. B*, 9, 119-127.
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Mazzarrino, G., Martuscelli, M., Scarpone, E., Paparella, A., 2015, Control of household mycoflora in fermented sausages using phenolic fractions from olive mill wastewaters, *International Journal of Food Microbiology*, 207, 49-56.
- Chen, W. Z., and Hosney, R. C., 1995, Development of an objective method for dough stickiness, *LWT-Food Science and Technology*, 28(5), 467-473.
- Cingöz, A., Akpınar, Ö., Sayaslan, A., 2022, Farklı Kepek Fraksiyonlarının Ekmek Kalitesine Etkisi, *Gıda*, 47(2), 372-386.
- Conterno, L., Martinelli, F., Tamburini, M., Fava, F., Mancini, A., Sordo, M., ... and Tuohy, K., 2019, Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the

gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects, *European journal of nutrition*, 58, 63-81.

- Curtis, P. J., Van Der Velpen, V., Berends, L., Jennings, A., Feelisch, M., Umpleby, A. M., ... and Cassidy, A., 2019, Blueberries improve biomarkers of cardiometabolic function in participants with metabolic syndrome—results from a 6-month, double-blind, randomized controlled trial, *The American journal of clinical nutrition*, 109(6), 1535-1545.
- Czajkowska–González, Y., Alvarez-Parrilla, E., Del Rocio Martinez-Ruiz, N., Vázquez-Flores, A., Gaytán-Martinez, M., De La Rosa, L., 2021, Addition of phenolic compounds to bread: antioxidant benefits and impact on food structure and sensory characteristics, *Food Production, Processing and Nutrition*, 3,25.
- Çelik, Ö. F., Tunçil, Y. E., 2020, Antioxidant Activity, Total Phenolic and Saponin Contents of Quinoa Seeds Having Different Hull Colors as Affected by Washing Process, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 11-24.
- Çevre ve Şehircilik Bakanlığı. URL: <https://zeytinay.csb.gov.tr/zeytinyagi-uretim-proseslerinin-karsilastirilmesi-i-5620> (son erişim tarihi: 05.05.2024).
- D’Antuono, I., Kontogianni, V.G., Kotsiou, K., Linsalata, V., Logrieco, A. F., Tasioula-Margari, M., Cardinali, A., 2014, Polyphenolic characterization of olive mill wastewaters, coming from Italian and Greek olive cultivars, after membrane technology, *Food Research International* 65, 301–310.
- De Bruno, A., Romeo, R., Fedele, F. L., Sicari, A., Piscopo, A., and Poiana, M., 2018, Antioxidant activity shown by olive pomace extracts, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(8), 526-533.
- De Bruno, A., Romeo, R., Piscopo, A., and Poiana, M., 2021, Antioxidant quantification in different portions obtained during olive oil extraction process in an olive oil press mill, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(3), 1119-1126.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Lembo, G., Aretini, A., Nag, A., 2007, Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater, *Food Chemistry*, 100(3), 998-1004.
- Değirmencioğlu, N., Gürbüz, O., Değirmencioğlu, A., and Yıldız, S. 2011, Effects of water extract from *Olea euopeae* on the shelf life of microbiological and sensory attributes of wheat bread.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., and Le Blay, G., 2013, Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures, *Food Control*, 30(1), 206-213.
- Dunn, K. L., Yang, L., Girard, A., Bean, S. and Awika, J. M. 2015. Interaction of sorghum tannins with wheat proteins and effect on in vitro starch and protein

- digestibility in a baked product matrix, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4), 1234-1241.
- Dupuis, J. H., and Liu, Q., 2019, Potato starch: a review of physicochemical, functional and nutritional properties, *American Journal of Potato Research*, 96(2), 127-138.
- Elgün, A., Ertugay, Z. 2002. Tahıl İşleme Teknolojisi, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 97, 411.
- Elgün, A., Türker, S., Bilgiçli, N. 2001. Tahıl ve Ürünlerine Analitik Kalite Kontrolü, *Konya Ticaret Borsası*. Yayın No:2 Konya.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., and Cummings, J. H., 1992, Classification and measurement of nutritionally important starch fractions, *European journal of clinical nutrition*, 46, S33-50.
- Englyst, K. N., Vinoy, S., Englyst, H. N., and Lang, V., 2003), Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose, *British Journal of Nutrition*, 89(3), 329-339.
- Esposito, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Urbani, S., Veneziani, G., Selvaggini, R., ... and Servili, M., 2015, Effect of an olive phenolic extract on the quality of vegetable oils during frying, *Food chemistry*, 176, 184-192.
- FAOSTAT, 2018. Production, Crops, Olives, URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (son erişim tarihi: 05.06.2024).
- Fasolato, L., Cardazzo, B., Balzan, S., Carraro, L., Taticchi, A., Montemurro, F., and Novelli, E., 2015, Minimum bactericidal concentration of phenols extracted from oil vegetation water on spoilers, starters and food-borne bacteria, *Italian journal of food safety*, 4(2).
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., and Jiménez, A. 2006, Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste, *Grasas y aceites*, 57(1), 95-106.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., and Temussi, F., 2003, Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 1005-1009.
- Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S., 2005, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants, *Food Chemistry*, 93(2), 197-204.
- Francis, F. J. 1998. Colour analysis, in: Food Analysis, S. S. Nielsen (Ed.), An Aspen Publishers, Maryland, Gaithersnurg, USA, pp. 599-612.

- Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A., 2013, Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5179-5188.
- Galanakis, C. M. 2016. Olive mill waste: recent advances for sustainable management.
- Galanakis, C. M., Tsatalas, P., Charalambous, Z., and Galanakis, I. M., 2018, Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater, *Environmental technology & innovation*, 10, 1-15.
- Galanakis, C.M., Martínez-Saez, N., del Castillo, M.D., Barba, F.J., Mitropoulou, V.S. 2015, Patented and commercialized applications (Chapter 15). Galanakis, C.M. (Ed.), *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Elsevier-Academic Press, USA.
- Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., and Ugglá, M., 2000, Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2021-2027.
- Garnier, L., Valence, F., and Mounier, J., 2017, Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update, *Microorganisms*, 5(3), 42.
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., Tomiło, J., and Czyż, J., 2013, Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin, *Food Chemistry*, 138(2-3), 1621-1628.
- Gerçekaslan, K. E., Kotancılar, H. G., and Karaoğlu, M. M., 2007, Ekmek bayatlaması ve bayatlama derecesini ölçmede kullanılan yöntemler: I, *Gıda*, 32(6), 305-315.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., and Saari, N., 2012, Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) —a review, *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3291-3340.
- Girard, A. L., and Awika, J. M., 2018, Sorghum polyphenols and other bioactive components as functional and health promoting food ingredients, *Journal of Cereal Science*, 84, 112-124.
- Goh, R., Gao, J., Ananingsih, V. K., Ranawana, V., Henry, C. J., and Zhou, W., 2015, Green tea catechins reduced the glycaemic potential of bread: An in vitro digestibility study, *Food Chemistry*, 180, 203-210.
- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., and Scarlett, C. J., 2018, Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace, *Lwt*, 89, 284-290.
- Goni, I., Garcia-Alonso, A., and Saura-Calixto, F., 1997, A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index, *Nutrition research*, 17(3), 427-437.

- Gönenç, S. 2011. TR63 bölgesi zeytincilik sektör raporu ve fizibilite çalışması, *T.C. Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı*.
- Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., and Xiao, J., 2018, Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review, *Phytochemistry Reviews*, 17, 1091-1110.
- Gyamfi, M. A., Yonamine, M., and Aniya, Y., 1999, Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries, *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(6), 661-667.
- Gyawali, R., and Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.
- Han, H. M., and Koh, B. K., 2011, Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2495-2499.
- Hasanaha, M., and Hilmaa, P. S., 2016, Antioxidant activity of extract and fractions from Coffee arabica L. leaves by DPPH radical scavenging method, *Sci. Eng*, 3(4).
- He, H., and Hosney, R. C., 1990, Changes in bread firmness and moisture during long-term storage, *Cereal chemistry*, 67(6), 603-605.
- Hemdane, S., Leys, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Delcour, J. A., and Courtin, C. M., 2015, Wheat milling by-products and their impact on bread making, *Food Chemistry*, 187, 280-289.
- Huang, Y. W., Liu, Y., Dushenkov, S., Ho, C. T., and Huang, M. T. (2009). Anti-obesity effects of epigallocatechin-3-gallate, orange peel extract, black tea extract, caffeine and their combinations in a mouse model, *Journal of Functional Foods*, 1(3), 304-310.
- Issaoui, M., Dabbou, S., Mechri, B., Nakbi, A., Chehab, H., and Hammami, M., 2011, Fatty acid profile, sugar composition, and antioxidant compounds of table olives as affected by different treatments, *European Food Research and Technology*, 232, 867-876.
- Jusoh, Y. M., Chin, N. L., Yusof, Y. A., and Rahman, R. A., 2008, Bread crust thickness estimation using LAB colour system, *Pertanika Journal of Science & Technology*, 16(2), 239-247.
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., and Mantzavinos, D., 2013, Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management, *Journal of Environmental Management*, 128, 749-758.

- Karaağaoğlu, N., Karabudak, E., Yavuz, S., Yüksek, O., Dinçer, D., Tosunbayraktar, G., and Eren, F. H., 2008, Çeşitli ekmeklerin protein, yağ, nem, kül, karbonhidrat ve enerji değerleri, *Gıda*, 33(1), 19-25.
- Khan, N., and Mukhtar, H., 2009, Green tea catechins: Anticancer effects and molecular targets, *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, 165-183.
- Kiritsakis, A. P., Lenart, E. B., Willet, W. C., Hernandez, R. J., 1998. "Olive oil. Food and Nutrition Press Inc." 348s. Connecticut. USA.
- Klinchongkon, K., Intim, B., Milasing, N., and Khuwijitjaru, P., 2022, Effect of ethanol concentration and temperature on solubility of fructose, *Food Science and Technology Research*, 28(1), 105-109.
- Köksal, E., Tohma, H., Kılıç, Ö., Alan, Y., Aras, A., Gülçin, İ., and Bursal, E., 2017, Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*: analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS, *Scientia pharmaceutica*, 85(2), 24.
- Lai, P. K., and Roy, J., 2004, Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices, *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1451-1460.
- Leouifoudi, I., Harnafi, H., and Zyad, A., 2015, Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities, *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2015(1), 714138.
- Li, M., Pernell, C., and Ferruzzi, M. G., 2018, Complexation with phenolic acids affect rheological properties and digestibility of potato starch and maize amylopectin, *Food Hydrocolloids*, 77, 843-852.
- Lin, J., and Zhou, W., 2018, Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread, *Journal of Functional Foods*, 40, 299-306.
- Lomolino, G., Morari, F., Dal Ferro, N., Vincenzi, S., and Pasini, G., 2017, Investigating the einkorn (*Triticum monococcum*) and common wheat (*Triticum aestivum*) bread crumb structure with X-ray microtomography: effects on rheological and sensory properties, *International Journal of Food Science & Technology*, 52(6), 1498-1507.
- Lopez, A., García, P., and Garrido, A., 2008, Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition, *Food Chemistry*, 106(1), 369-378.
- Marinopoulou, A., Papageorgiou, M., Irakli, M., and Gerasopoulos, D., 2020, Effect of olive pulp enrichment on physicochemical and antioxidant properties of wheat bread, *International Journal of Food Studies*, 9(1).

- Marques, F. Z., Markus, M. A., and Morris, B. J., 2009, Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(11), 2125-2128.
- Marsilio, V., Campestre, C., & Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74(1), 55-60.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2019). Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *European journal of nutrition*, 58, 865-878.
- Matos, M. E., and Rosell, C. M., 2012, Relationship between instrumental parameters and sensory characteristics in gluten-free breads, *European Food Research and Technology*, 235(1), 107-117.
- Memis E., Sanlier N. 2009. "Glisemik İndeks ve Sağlık İlişkisi." Gazi Universitesi Endüstriyel Sanatlar Eğitim Fakültesi Dergisi.; 24, 17-27.
- Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., & Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes, *Applied microbiology and biotechnology*, 82, 25-39.
- Ndife, J., Abdulraheem, L. O., and Zakari, U. M., 2011, Evaluation of the nutritional and sensory quality of functional breads produced from whole wheat and soya bean flour blends, *African Journal of Food Science*, 5(8), 466-472.
- Nunes, M. A., Palmeira, J. D., Melo, D., Machado, S., Lobo, J. C., Costa, A. S. G., ... and Oliveira, M. B. P. P. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of a new olive pomace functional ingredient, *Pharmaceuticals*, 14(9), 913.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., and Stockmann, R., 2005, Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., and Andrade, P. B., 2009, Phenolics: From chemistry to biology, *Molecules*, 14(6), 2202-2211.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... and Bento, A., 2006, Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8425-8431.
- Peressini, D., and Sensidoni, A., 2009, Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs, *Journal of cereal Science*, 49(2), 190-201.

- Piperidou, C. I., Chaidou, C. I., Stalikas, C. D., Soulti, K., Pilidis, G. A., and Balis, C., 2000, Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1941-1948.
- Puric, M., Rabrenovic, B., Rac, V., Pezo, L., Tomasevic, I., and Demin, M., 2020, Application of defatted apple seed cakes as a by-product for the enrichment of wheat bread. *Lwt*, 130, 109391.
- Purlis, E., 2010, Browning development in bakery products—A review, *Journal of Food Engineering*, 99(3), 239-249.
- Rajurkar, N. S., and Hande, S. M., 2011, Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants, *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(2), 146.
- Ribeiro, T. B., Oliveira, A., Coelho, M., Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., ... and Pintado, M., 2021, Are olive pomace powders a safe source of bioactives and nutrients?, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1963-1978.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., and Mantzavinou, A., 2002, Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596-601.
- Rodrigues, F., da Mota Nunes, M. A., and Oliveira, M. B. P. P., 2017, Applications of recovered bioactive compounds in cosmetics and health care products, In *Olive Mill Waste* (pp. 255-274). Academic Press.
- Roila, R., Branciari, R., Ranucci, D., Ortenzi, R., Urbani, S., Servili, M., and Valiani, A., 2016, Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese, *Italian journal of food safety*, 5(2).
- Saccotelli, M. A., Conte, A., Burrafato, K. R., Calligaris, S., Manzocco, L., and Del Nobile, M. A., 2017, Optimization of durum wheat bread enriched with bran, *Food science & nutrition*, 5(3), 689-695.
- Sanchez de Medina, V., Priego-Capote, F., Jimenez-Ot, C., and Luque de Castro, M. D., 2011, Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11432-11441.
- Servili, M., Rizzello, C. G., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Mazzacane, F., ... and Di Cagno, R., 2011, Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 45-52.
- Simonato, B., Trevisan, S., Tolve, R., Favati, F., and Pasini, G., 2019, Pasta fortification with olive pomace: Effects on the technological characteristics and nutritional properties, *Lwt*, 114, 108368.

- Singleton, V. L., and Rossi, J. A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, 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). Academic press.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., and Perera, C. O., 2010, Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A review. *Journal of food science*, 75(8), 163–174.
- Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., Galanakis, C. M. 2017. “Olive oil production sector: Environmental effects and sustainability challenges (Chapter 1)”. Galanakis, C.M. (Ed.), *Oil Mill Waste*. Elsevier-Academic Press, USA.
- Susamcı, E., Ötleş, S., and Irmak, Ş., 2011, Sofralık zeytinin besin öğeleri, duyuşal karakterizasyonu ve işleme yöntemleri arasındaki etkileşimler, *Zeytin Bilimi*, 2(2), 65-74.
- Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlıh, F., Riepl, H., and Azaizeh, H., 2011, Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1), 431021.
- Tanılğan, K., Özcan, M. M., and Ünver, A., 2007, Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils, *Grasas y aceites*, 58(2), 142-147.
- Tapia-Quirós, P., Montenegro-Landívar, M. F., Reig, M., Vecino, X., Alvarino, T., Cortina, J. L., ... and Granados, M., 2020, Olive mill and winery wastes as viable sources of bioactive compounds: A study on polyphenols recovery, *Antioxidants*, 9(11), 1074.
- Thompson, L. U., and Yoon, J. H. (1984). Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of food science*, 49(4), 1228-1229.
- Tok, H., and Ertaş, N., 2021, The effects of germinated seeds on nutritional and technological properties of bread, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), 1183-1193.
- Tolve, R., Simonato, B., Rainero, G., Bianchi, F., Rizzi, C., Cervini, M., and Giuberti, G., 2021, Wheat bread fortification by grape pomace powder: Nutritional, technological, antioxidant, and sensory properties, *Foods*, 10(1), 75.
- Tornberg, E., Galanakis, C. 2010. “Olive waste recovery”. U.S. Patent No: US 2010O240769A1.

- Troise, A. D., Fiore, A., Colantuono, A., Kokkinidou, S., Peterson, D. G., and Fogliano, V., 2014, Effect of olive mill wastewater phenol compounds on reactive carbonyl species and Maillard reaction end-products in ultrahigh-temperature-treated milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(41), 10092-10100.
- Tuncil, Y. E., Jondiko, T., Castell-Perez, M. E., Puerta-Gomez, A. F., and Awika, J. M., 2016, Small deformation rheological properties of dough are useful tool to predict the effects of modest sodium reduction on flour tortilla quality, *LWT-Food Science and Technology*, 68, 329-333.
- Tunç, M. S., Ünlü, A., 2015, Zeytinyağı üretim atıksularının özellikleri, çevresel etkileri ve arıtım teknolojileri, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Degrısı*, 4(2), 44-74.
- Uslu, N., and Özcan, M. M., 2020 The effect of irrigation and harvest time on bioactive properties of olive fruits issued from some olive varieties grown in Mediterranean region, *European Food Research and Technology*, 246, 2587-2599.
- Uylaşer, V., and Yildiz, G., 2014, The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1092-1101.
- Veneziani, G., Novelli, E., Taticchi, A., Servili, M. 2017. "Application of recovered bioactive compounds in food products". In, *Olive Mill Waste Recent Advances for Sustainable Management*, pp. 231–253. C. M. Galanakis Ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Vitali, D., Dragojevic, I. V., and Sebecic, B., 2009, Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits, *Food chemistry*, 114(4), 1462-1469.
- Wang, Z., Wang, C., Zhang, C., and Li, W., 2017, Ultrasound-assisted enzyme catalyzed hydrolysis of olive waste and recovery of antioxidant phenolic compounds, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 224-234.
- Whitney, K., and Simsek, S., 2020, Potato flour as a functional ingredient in bread: evaluation of bread quality and starch characteristics, *International Journal of Food Science & Technology*, 55(12), 3639-3649.
- Xu, J., Wang, W., and Li, Y., 2019, Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review, *Journal of functional foods*, 52, 629-639.
- Xue, J., Davidson, P. M., and 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.

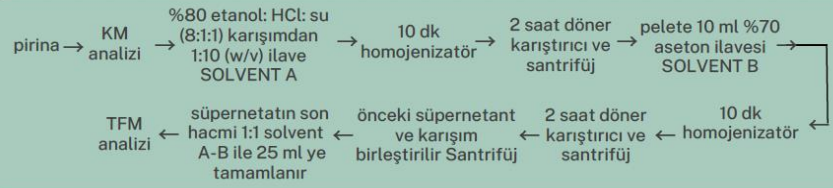
- Yakhlef, W., Arhab, R., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A., and Medina, E., 2018, Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products, *Lwt*, 93, 323-328.
- Yangui, T., Sayadi, S., Gargoubi, A., and Dhouib, A., 2010, Fungicidal effect of hydroxytyrosol-rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*, *Crop protection*, 29(10), 1208-1213.
- Yıldız, G., Uylaşer, V., 2011. "Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein." *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 25, 131-142.
- Yoo, J. S., Seog, E. J., and Lee, J. H., 2006, Quality bread as influenced by sweet pumpkin powder, *Preventive Nutrition and Food Science*, 11(4), 339-343.
- Yorulmaz, A., Poyrazoglu, E. S., Ozcan, M. M., and Tekin, A., 2012, Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), 1083-1093.
- Yu, L., Nanguet, A. L., and Beta, T., 2013, Comparison of antioxidant properties of refined and whole wheat flour and bread. *Antioxidants*, 2(4), 370-383.
- Zhong, Y., Chiou, Y. S., Pan, M. H., Ho, C. T., and Shahidi, F., 2012, Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice, *Journal of Functional Foods*, 4(1), 323-330.
- Zhu, F., 2015, Interactions between starch and phenolic compound, *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 129-143.
- Zieliński, H., and Kozłowska, H., 2000, Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2008-2016.

EKLER

EK-1 Pirina etanolik ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarının artırılabilirliğinin araştırılması için denenen 22 farklı metot detayları. Şeklin devamı aşağıdadır.

Pirinanın Toplam Fenolik Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Yöntemler	
1. Alternatif metot	pirina → kurutma → öğütme ve eleme → 10 ml %80 etanol ilavesi 1:10 (w/v) → 6 saat çalkalama → santrifüj → TFM analizi
2. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 6 saat çalkalama → santrifüj → TFM analizi
3. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
4. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 1 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
5. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 15 dk sonikatör → santrifüj → pelete 5ml %80 etanol → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
6. Alternatif metot	pirina → kurutma → öğütme ve eleme → 10 ml %80 etanol ilavesi 1:10 (w/v) → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
7. Alternatif metot	pirina → kurutma → öğütme ve eleme → 10 ml %80 etanol ilavesi 1:10 (w/v) → 1 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
8. Alternatif metot	pirina → kurutma → öğütme ve eleme → 10 ml %80 etanol ilavesi 1:10 (w/v) → 1 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → pelete 5ml %80 etanol → santrifüj → TFM analizi
9. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 1 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
10. Alternatif metot	pirina → kurutma → heksan muamelesi → öğütme ve eleme → SCO2 ekstraksiyon → TFM analizi
11. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 10 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
12. Alternatif metot	pirina → KM analizi → %80 etanol: HCl: su (8:1:1) karışımından 1:10 (w/v) ilave → 10 dk homojenizatör → 15 dk sonikatör → santrifüj → TFM analizi
13. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 10 dk homojenizatör → 1 saat sonikatör → 6 saat döner karıştırıcı ve santrifüj → TFM analizi
14. Alternatif metot	pirina → KM analizi → son konsantrasyon %80 etanol olacak şekilde ilave 1:10 (w/v) → 10 dk homojenizatör → 2 saat döner karıştırıcı ve santrifüj → TFM analizi

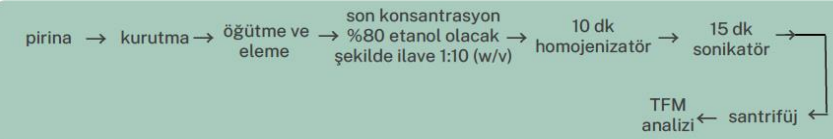
15. Alternatif metot



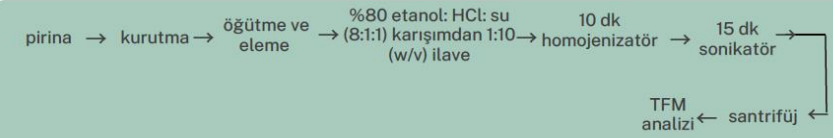
16. Alternatif metot



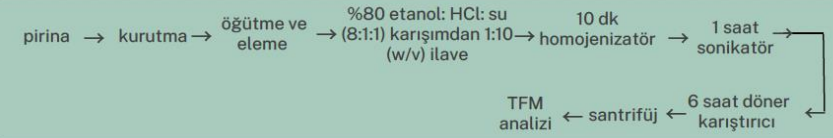
17. Alternatif metot



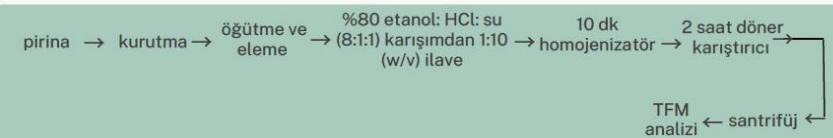
18. Alternatif metot



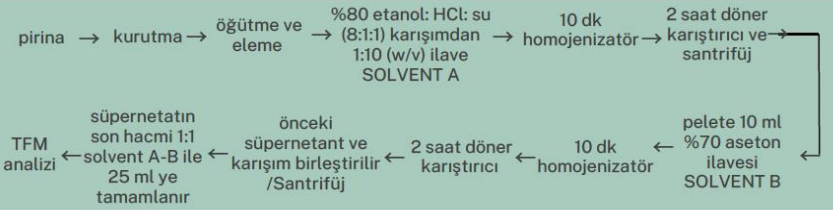
19. Alternatif metot



20. Alternatif metot



21. Alternatif metot



22. Alternatif metot



METOTLAR	%TFM (ağırlık üzerinden)	TFM (mg GAE/g kuru prına)
Ana metot	3.74±0,22	6,70±0,03
Alternatif metot 1	3.63±0.05	5,86±0.02
Alternatif metot 2	5.45±0.10	10,22±0.02
Alternatif metot 3	4.87±0.43	5,8±0.11
Alternatif metot 4	5.30±0.03	10,01±0.2
Alternatif metot 5	5.86±1.85	5,12±0.12
Alternatif metot 6	4.05±0.38	4,69±0.05
Alternatif metot 7	3.60±0.53	6,48±0.09
Alternatif metot 8	3.99±0.02	4,37±0.04
Alternatif metot 9	5.47±0.03	11,8±0.00
Alternatif metot 10	0.12±0.00	5,12±0.00
Alternatif metot 11	4.35±0.15	7,94±0.03
Alternatif metot 12	2.33±0.22	4,78±0.04
Alternatif metot 13	5.48±0.35	11,58±0.09
Alternatif metot 14	5.61±0.09	11,78±0.02
Alternatif metot 15	5.44±0.06	4,14±0.01
Alternatif metot 16	4.77±2.58	3,13±0.01
Alternatif metot 17	3.26±0.02	5,06±0.00
Alternatif metot 18	2.49±0.00	3,9±0.00
Alternatif metot 19	2.71±0.11	5,64±0.00
Alternatif metot 20	3.29±0.49	6,9±0.00
Alternatif metot 21	3.04±0.08	5,94±0.00
Alternatif metot 22	4.15±0.16	3,06±0.00