

**Atf İçin:** Yıldız E, 2022. Espresso İçeren Kahve İçeceklerinin Antioksidan Kapasite, Toplam Fenolik Bileşen ve *In-vitro* Biyoerişilebilirliğinin Karşılaştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(2):791-805, 2022.

**To Cite:** Yıldız E, 2022. Comparison of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content and *In-vitro* Bioaccessibility of Espresso Based Coffee Beverages. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(2):791-805, 2022.

## Espresso İçeren Kahve İçeceklerinin Antioksidan Kapasite, Toplam Fenolik Bileşen ve *In-vitro* Biyoerişilebilirliğinin Karşılaştırılması

Elif YILDIZ<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Kahve günlük yaşantımızda önemli bir yere sahip olan ve en sık tüketilen içeceklerden biridir. İçeriğindeki biyoaktif bileşenler sayesinde sağlık üzerinde antioksidan, antihipertansif, anti-inflamatuar, immünoprotektif, anti-karsinojen etkiler göstermektedir. Çalışma kapsamında, ticari olarak tüketime sunulan *Espresso*, *Americano*, *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha* kahve içeceklerinin antioksidan kapasite (ABTS ve DPPH Metotları) ve toplam fenolik bileşen miktarı (Folin-Ciocalteu Metodu) açısından analiz edilerek, içeceklerin biyoaktif potansiyellerinin kıyaslanması amaçlanmıştır. En yüksek değerler en yoğun kahve içeriğine sahip olan *Espresso* örneğinde belirlenmiş olup; ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir, biyoerişilebilir fenolik fraksiyonları sırasıyla TEAK<sub>ABTS</sub> sonuçlarına göre 28.15, 35.04, 30.28  $\mu\text{mol}$  Troloks  $\text{mL}^{-1}$ ; TEAK<sub>DPPH</sub> sonuçlarına göre ise 14.69, 17.98, 9.84  $\mu\text{mol}$  Troloks  $\text{mL}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Kahve örneklerinin içeriğindeki süt miktarı arttıkça antioksidan kapasite ve toplam fenolik bileşen değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Sütün buhar ile muamele edilerek köpük halinde eklenmesi, sıcak olarak eklenmesine göre nispeten daha yüksek değerler göstermiştir. Örneklerin % biyoerişilebilirlikleri ise, toplam fenolik bileşen içeriğine göre % 41-48 arasında değişmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** kahve, Espresso, süt, antioksidan kapasite, toplam fenolik bileşen, biyoerişilebilirlik

### Comparison of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content and *In-vitro* Bioaccessibility of Espresso Based Coffee Beverages

**ABSTRACT:** Coffee is one of the most frequently consumed beverage that has an important place in our daily life. Owing to bioactive components in its content, it has antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, immunoprotective, anti-carcinogenic effects on health. Within the scope of the study, it is aimed to compare the bioactive potential of commercially available *Espresso*, *Americano*, *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* and *Mocha* coffee drinks by analyzing the antioxidant capacity (ABTS and DPPH Methods) and the total phenolic compound (Folin-Ciocalteu Method). The highest values were determined in the *Espresso* sample, which has the most intense coffee content; extractable, hydrolyzable, bioaccessible phenolic fractions were determined respectively as 28.15, 35.04, 30.28  $\mu\text{mol}$  Troloks  $\text{mL}^{-1}$  according to TEAC<sub>ABTS</sub> and 14.69, 17.98, 9.84  $\mu\text{mol}$  Troloks  $\text{mL}^{-1}$  according to TEAC<sub>DPPH</sub>. By the increase of the milk amount in coffee samples, decrease was observed in the antioxidant capacity and total phenolic content results. Addition of steamed milk by steaming treatment showed relatively higher values compared to adding milk as hot. The bioaccessibility % of the samples varied between 41-48 % according to total phenolic content.

**Keywords:** coffee, Espresso, milk, antioxidant capacity, phenolic content, bioaccessibility

<sup>1</sup>Elif YILDIZ ([Orcid ID: 0000-0003-1356-9012](https://orcid.org/0000-0003-1356-9012)), Bursa Uludağ Üniversitesi, Keles Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Elif YILDIZ, e-mail: elifyildiz@uludag.edu.tr

## GİRİŞ

Kahve, toplumumuzda ve Dünya’da en sık tüketilen içeceklerin başında gelmektedir. Kahve içeceğine olan talebin ve tüketimin çok fazla olması sayesinde kahve çekirdeği, Dünya ticaretinin en değerli ürünleri arasında yer almaktadır. Kahve çekirdeğinin içeceğe dönüşümündeki yolculuğunda; kahvenin hazırlanma tekniğinin, içeceğin tadı, aroması ve içerdiği bileşenler üzerindeki etkisi ile bu tekniklerin teknolojik gelişmelerin ışığında her geçen gün değişmekte olduğu bilinmektedir. Önceleri, sadece kahve çekirdeklerinin kavrulması, öğütülmesi ve su ile demlenmesi ile başlayan yolculuk, 1900’lü yılların başında suda çözünebilen ‘granül’ kahvelerin hayatımıza girmesi ile 1. nesil kahvecilik olarak adlandırılan yeni bir sürece geçmiştir. Sonrasında Alfred Peet kahve kavurma tekniklerini geliştirmesi ile 2. nesil kahvecilik akımı oluşmuş Luigi Bazzera’nın *Espresso* makinesini tasarlaması ile bu akım yayılarak Dünya çapında kabul görmüştür. Ardından, günümüzce sıkça duyduğumuz, daha lezzetli ve zengin aromalı kahveler elde etmek amacı ile yeni demleme metotlarının geliştirildiği ve farklı kahve çekirdeklerinin harmanlandığı 3. Nesil kahvecilik süreci başlamıştır (Kaya ve Toker 2019).

İtalyan kahve kültürünün temelini oluşturan *Espresso*, 2. nesil kahvecilikte önemli bir yere sahip olan ve pek çok kahve içeceğinin alt gövdesini oluşturan bir başlangıç noktasıdır. Yaklaşık 7.5 gram kahvenin 9 bar su basıncı ve 84-95°C’deki su ile etkileşerek, 24-27 saniyelik akış (drip) zamanı sonucunda elde edilen, kahvenin özütünün basınç ile çıkarıldığı bir demlenme tekniğidir (Girginol 2018). *Espresso* bazlı kahve içecekleri ise; süt, süt köpüğü ve suyun farklı oranlarda bir araya getirilerek hazırlanması ve bunlara çikolata gibi içerikler eklenebilmesi ile servis edilmektedir. *Espresso*’nun sıcak su ilave edilerek seyreltilmesi ile *Americano* elde edilirken; sıcak süt eklenmesi ile *Latte*; süt köpüğü eklenmesi ile *Macchiato*; sıcak süt ve süt köpüğünün beraber eklenmesi ile *Cappuccino* elde edilmektedir. *Mocha* ise *Latte* gibi hazırlanmakta olup şurup ya da toz olarak çikolata eklenmesi ile servise hazır hale getirilmektedir (Baruönü ve Örs 2018). Kahve, içeriğinde yer alan kafein nedeniyle enerjiyi, zindeliği ve konsantre olma yeteneğini arttırmakta, toplumlarda sosyalleşmenin bir parçası olarak tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Bununla beraber, yapılan epidemiyolojik ve deneysel araştırmalardan elde edilen sonuçlar; kahvenin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, anti-hipertansif, anti-inflamatuar, immünoprotektif, anti-karsinojen, yaşlanma karşıtı, nöroprotektif ve antidiyabetik etkilerini de ortaya koymaktadır (Alongi ve ark., 2019; Rashidinejad ve ark., 2021). Yoğun kahve tüketiminin sağlık üzerinde olumsuz etki yapacağı düşünülmese de, Rao ve Fuller (2018), yaptıkları literatür araştırmalarının ışığında, gastro-intestinal semptomların haricinde, yoğun kahve tüketiminin sağlık üzerindeki olumlu etkileri ile ilişkili birçok özelliğinin belirlendiği ifade etmiştir.

Kahvenin sağlık üzerindeki olumlu potansiyeli, içeriğindeki biyoaktif bileşenlerle sağlanmakta olup, bunlardan klorojenik asitler (hidroksisinnamik asitlerin kinil esterleri), kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve proantosiyanidinler en fazla içeriğe sahip olanlardır (Clifford ve Knight, 2004). Kahve kuru ağırlığının % 6 ile % 10’u arasında değişen, ana yapısı kinik, kafeik, ferulik ve *p*-kumarik asit gibi hidroksisinnamik asitlerin konjugasyonuna dayanan klorojenik asitlerin üç ana grubunu içermektedir: kafeoilkinik asitler, feruloilkinik asitler, di-kafeoilkinik asitler (Clifford ve Knight, 2004). Ayrıca, yeşil kahve çekirdeğinde bulunan fenolik bileşiklerin aktivitesine ek olarak, çekirdeğin kavrulması sırasında ısıyla indüklenen Maillard reaksiyon ürünleri gibi bileşikler, kahvenin sağlık üzerindeki olumlu etkisinde rol oynamaktadır (Vignoli ve ark., 2011).

Kahve genellikle tadını iyileştirmek, burukluğunu azaltmak, hemen tüketilmek üzere sıcak infüzyonun sıcaklığını düşürmek ve kafein etkisini azaltmak gibi yaklaşımlardan ya da tüketicinin

beslenme alışkanlığından dolayı süt ilave edilerek tüketilmektedir. Süt proteinleri olarak bilinen kazeinler ve peynir altı suyu proteinleri, nihai üründe uygun dokusal ve işlevsel özellikleri geliştirmesinin yanı sıra emülsifiye edici, köpürtücü etkilere de sahiptir. Süt yağı ise doku ve kremalılık algısı ile fonksiyonel özelliklere katkı sağlamaktadır (Niseteo ve ark., 2012).

Kullanımının yaygın olması ve bireylerin süregelen tüketim alışkanlıklardan dolayı kahve içeceklerine, genellikle inek sütü eklenmekte olup; daha doymun bir tada sahip olması, aromaya katkı sağlaması ve sütün köpük oluşumunu desteklemesi nedeniyle de yağlı süt tercih edilmektedir. İnek sütü; süt kazeini ve  $\alpha$ -kazein,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazein gibi alt birimleri ile antioksidan özelliklere sahip olmasının yanı sıra demir ile indüklenen peroksidasyonu inhibe edici etkiye de sahiptir (Zulueta ve ark., 2009). Ayrıca kazeinden (proteolitik enzim yoluyla) ve  $\beta$ -lactoglobulinden elde edilen peptitler de antioksidan potansiyeli güçlendirmektedir (Hernández-Ledesma ve ark., 2005). Sütün içeriğinde yer alan antioksidan olarak E vitamini, karotenoid ve ubikinol gibi bileşenler lipit fazda etkinlik gösterirken; C vitamini sulu fazda etkinlik göstermektedir. İçeriğinde yer alan flavonoid ve benzer biyoaktif bileşenler ise, hem lipit hem de sulu fazda etkinlik gösterebilmektedir (Lindmark-Månsson ve Åkesson, 2000). Sütün antioksidatif bileşenleri, lipit peroksidasyonunun önlenmesinde ve süt kalitesinin korunmasında rol oynarken, gıdalar ve farmasötiklerin içeriklerine sağlık üzerindeki etkilerini arttırmak amaçlı da eklenebilmektedir (Zulueta ve ark., 2009). Bununla birlikte literatürde yer alan çalışmalar, işleme ve süt matrislerinin kahvenin fenolik içeriği ile antioksidan kapasitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Tagliazucchi ve ark., 2012; Alongi ve ark., 2019; Quan ve ark., 2020).

Antioksidanlar ve gıdaların antioksidan özellikleri, bireylerin sağlıklı yaşamının sürdürülmesi, sağlıklı gıda ürünleri elde edilmesi ve gıdaların sağlık üzerindeki potansiyellerinin ortaya koyulması ile ilgili olarak son zamanların dikkat çeken konuları arasında yer almaktadır. Antioksidanlar, vücutta oksidatif stres ile meydana gelen serbest radikal oluşumunu engelleyen veya serbest radikallerle reaksiyona girerek serbest radikallerin hücrelere zarar vermesini engelleyen biyoaktif bileşenlerdir. Bu bileşenlerin gıdalardaki içeriği belirlemek amacı ile antioksidan kapasite analizleri son yıllarda en çok çalışılan metotlar arasında olup; hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan ve elektron transferine (ET) dayanan antioksidan kapasite analizleri olmak üzere iki ana başlıkta toplanmaktadır (Prior ve ark., 2005). Metotlar arasında en yaygın olanlar DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ve Toplam Fenolik Bileşen analizidir (Folin-Ciocalteu Metodu). Söz konusu metotlar; kolay uygulanabilir ve tekrar edilebilir olması nedeniyle tercih edilmekte olup mevcut literatürle kıyaslama açısından da öne çıkmaktadır.

Antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşikler, kompleks yapılar halinde gıda içerisinde bulunmakta ve vücuda alındıktan sonra maruz kaldığı sindirim süreci sonucunda etkilerini metabolik sirkülasyon içerisinde gösterebilmektedir (Bermúdez-Soto ve ark., 2007). Vücuda alınan her fenolik bileşenin vücutta sindirilebilmesi, sindirilen her bileşenin de etkisini tamamen gösterebilmesi mümkün değildir. Polifenoller, gıda matrisinde karmaşık yapılar halinde bulunmaktadır. Bu noktada biyoerişilebilirlik ve biyoalınabilirlik kavramları dikkat çekmektedir. Biyoerişilebilir, biyolojik sirkülasyonda etkisini gösterebilen fenoliklerin vücutta sindirim enzimlerince sindirilen içeriğinin miktarını ifade etmekte olup, biyoalınabilirlik ise bağırsaktan emildikten sonra kanda ve idrarda bulunan biyoaktif bileşen içeriğinin miktarını ifade etmektedir (Bermúdez-Soto ve ark., 2007; Porrini ve Riso 2008). Biyolojik erişilebilirlik, bileşiklerin gıda matrislerinden salınmasına ve bu bileşiklerin gastro-intestinal sistemdeki stabilitesine bağlıdır. Fenolik bileşenlerin biyoerişilebilirliği üzerinde;

gıda matrisi, sindirim enzimleri, fenolikler bileşiklerin özellikleri ve kombinasyonlarının yanı sıra birey ile ilgili özellikler gibi birçok faktör etkilidir (Ekbatan ve ark., 2016). Biyoaktif bileşenlerin matristen salınım hızı, bunların mikro hücrelere dahil edilmesi ve ayrıca diğer reaktanlar ve gastro-intestinal sistemde birlikte alınan materyallerle reaksiyon kinetiği, biyoerişilebilirliği artırabilmekte veya azaltabilmektedir (McClements ve Xiao 2014). Gıdaların sahip olduğu biyoaktif bileşen potansiyelleri, sindirim enzimleri yardımıyla, *in-vitro* ortamda, yapay sindirim prosesi oluşturularak ekstraksiyon sağlanması ve antioksidan kapasite analizleri yardımıyla değerlendirilmesi ile belirlenebilmektedir.

Kahve içecekleri bileşenlerinin birbirleri ile olan etkileşimleri ve bu etkileşimlerin mekanizmalarını değerlendiren pek çok çalışma literatürde mevcuttur (Dupas ve ark. 2006; Quan ve ark. 2020). Fakat en çok tüketimi gerçekleştirilen kahve içeceklerinin, Dünya çapında kabul görmüş formülasyonlar sonucunda hazırladığında, elde edilen son ürünlerin biyoaktif potansiyellerinin belirlendiği ve karşılaştırmalarının yapıldığı bir çalışma henüz mevcut değildir. Bu çalışma kapsamında, tüketimi sıklıkla gerçekleştirilen, *Espresso* ve *Espresso* bazlı kahve içecekleri olan *Americano*, *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha*'nın ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonlarının antioksidan kapasite (ABTS ve DPPH metotlarına göre) ve toplam fenolik bileşen (Folin-Ciocalteu Methodu) değerleri ile analiz sonuçlarının % biyoerişilebilirlikleri belirlenerek kahve örneklerinin biyoaktif potansiyelleri değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Kahve içeceği örnekleri, yerel bir 3. nesil kahve dükkânı olan Coffee Sinky Kahve Dükkanı'ndan (Osmanгази, Bursa) temin edilmiştir. Çalışma kapsamında, *Espresso*, *Americano*, *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha* kahve örnekleri incelenmiştir. Kahvelerin yapımında Arabica türüne ait Guatemala (% 50) ve Kolombiya (% 50) kahve çekirdekleri kullanılmıştır. Kahve çekirdekleri orta derecede kavrulmuş; kavrulma işleminin ardından 6-7 gün süre degaz süreci geçirmiş ve öğütülmesinin ardından taze çekilmiş (300-600  $\mu\text{m}$ ) olarak kahve içeceklerinin yapımında kullanılmıştır. Kahve içecekleri; Astoria marka, Gloria model, 11 L basınç kazanlı, çift port filtreli kahve makinesi ile hazırlanmıştır. Kahvelerin içeriğinde kullanılan *Espresso* shot'lar; 9 gram kahveden, 9 bar basınç ile 92 °C'deki suyun 30 sn. süre geçirilmesi ile 27-28 mL hacimle elde edilmiştir. *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha* kahve örneklerine tam yağlı inek sütü (% 3) ilave edilmiştir. *Mocha* yapımında çikolata şurubu (Caliente, Katsan Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul) kullanılmıştır. Kahve örneklerinin içeriği Çizelge 1'de verilmiştir. Kahve örnekleri ticari olarak satışı yapılan işletmeden temin edildikten sonra, oda sıcaklığına getirilerek, örnek hazırlama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 1.** Kahve Örneklerinin İçerikleri

Örnek	Örnek Kodu	Kahve İçeriği (g)*	Su İçeriği (mL)	Süt İçeriği (mL)	Süt Köpüğü İçeriği (mL)
<i>Espresso</i>	<i>Esp</i>	9	28	0	0
<i>Americano</i>	<i>Amr</i>	9	200	0	0
<i>Macchiato</i>	<i>Mac</i>	9	28	0	20
<i>Latte</i>	<i>Lat</i>	9	28	200	0
<i>Cappuccino</i>	<i>Cap</i>	9	28	100	100
<i>Mocha**</i>	<i>Moc</i>	9	28	200	0

\*Kahve içeriği için *Espresso* shot baz alınmıştır. 9 gram kahve içeriğine göre hazırlanmıştır. 1 shot; 28 mL olup, 9 gram öğütülmüş kahve içermektedir.

\*\**Mocha*, 3 pump:15 mL çikolata şurubu içeriğine sahiptir.

## Yöntemler

### Fiziko-kimyasal ve kimyasal analizler

Fiziko-kimyasallar analizler kapsamında, ticari olarak satışı yapılmakta olan kahve içecekleri işletmeden temin edildikten sonra, oda sıcaklığına getirilerek toplam asitlik ve pH analizleri gerçekleştirilmiştir. pH analizi pH 211 model Hanna marka pH-metre (Hanna Instruments S.R.L., ABD) ile AOAC Metot No: 981.12 göre; toplam asitlik tayini ise AOAC Metot No:942.15'ye göre belirlenmiş ve klorojenik asit cinsinden hesaplanmıştır (AOAC, 1990).

### Antioksidan kapasite ve toplam fenolik bileşen analizleri

#### Fenolik madde ekstraksiyonu

Kahve örnekleri, Vitali ve ark. (2009)'nın metotlarına göre ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonları elde edilerek analiz edilmiştir. 2 mL kahve örneği, HCl/metanol/su (1:80:10, v/v) eklenerek, 20°C'deki çalkalayıcı su banyosunda (250 rpm) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ABD) ekstrakte edilmiştir. Ardından 3500 rpm devir ile santrifüj edilmiş (4°C, 10 dk) (3 K 30, Sigma Santrifüj, Almanya) ve sıvı ekstrakte edilebilir fenolik fraksiyonu olarak ayrılırken, kalıntının üzerine 20 mL metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10:1, v/v) eklenerek 85°C'deki çalkalayıcı su banyosunda (250 rpm), 20 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonu takiben, içerikler 3500 rpm devir ile santrifüj edilmiş (4°C, 10 dk), ve sıvı kısım hidrolize edilebilir fenolik fraksiyonu olarak ayrılmıştır. *In-vitro* enzimatik ekstraksiyon prosedürü (Bouayed ve ark., 2012) göre uygulanmış olup, 2 mL kahve örneği alınmış ve pepsin enzimi (40 mg mL<sup>-1</sup>, 0.1 M HCl, Sigma-Aldrich, Almanya) eklendikten sonra 37°C'deki çalkalayıcı su banyosunda (250 rpm) 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından, pankreatin enzimi (2 mg mL<sup>-1</sup>) ve 'bile (safra, Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı' (12 mg mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek 2 saat daha çalkalama işlemine (37°C, 250 rpm) devam edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda örnekler, santrifüj edilmiştir (15°C, 3500 rpm, 10 dk) ve sıvı kısım biyoerişilebilir fenolik fraksiyonu olarak ayrılmıştır. Kahve örneklerinin 3 farklı ekstraksiyonu, analizlere kadar -18°C'de depolanmıştır.

#### Antioksidan kapasite analizleri

Kahve örnekleri fenolik bileşenlerinin antioksidan kapasitesi; ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonları açısından ABTS ve DPPH metotları olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. ABTS metodu için Apak ve ark. (2008)'in prosedürlerine göre; 7mM ABTS sulu çözeltisi, 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> sulu çözeltisi ile karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletilmiş, elde edilen çözelti 1:10 (v/v) oranında % 96'lık etanol ile seyreltilmiştir. Ekstraktlar ABTS çözeltisi ile muamele edildikten sonra, 6 dk karanlıkta bekletilmiş, absorbansları 734 nm'de spektrofotometrik (Optizen 3220UV, Mecays, Güney Kore) olarak belirlenmiştir. 0.02-0.08 µmol Troloks aralığındaki standart çözeltiler ile hazırlanan  $y=2979.8x-1.9041$  ( $R^2=0.9997$ ) kalibrasyon eğrisinden faydalanarak hesaplamalar yapılmış, sonuçlar µmol Troloks eşdeğeri (TE) mL<sup>-1</sup> örnek olarak ifade edilmiştir.

DPPH metodu için, Brand-Williams ve ark. (1995)'nin prosedürlerine göre,  $6 \times 10^{-5}$  M DPPH çözeltisi ile ekstraktların muamele edilmesi, 30 dk karanlıkta bekletilmesi ile absorbansları 515 nm'de spektrofotometrik (Optizen 3220UV, Mecays, Güney Kore) olarak belirlenmiştir. 0.02-0.08 µmol Troloks aralığındaki standart çözeltiler ile hazırlanan  $y=4004.8x-1.0638$  ( $R^2=0.9985$ ) kalibrasyon eğrisinden faydalanarak hesaplamalar yapılmış, sonuçlar µmol Troloks eşdeğeri (TE) mL<sup>-1</sup> örnek olarak ifade edilmiştir. Antioksidan kapasite verileri, üçlü analiz sonucunun ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

### Toplam fenolik bileşen analizi

Kahve örneklerinin toplam fenolik bileşen (TFB) analizi Folin-Ciocalteu metoduna göre Apak ve ark. (2008)'nin analitik prosedürleri uygulanarak yapılmıştır. % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH çözeltisi içinde çözündürülerek Lowry A çözeltisi; % 0.5'lik CuSO<sub>4</sub>, % 1 NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> çözeltisi içerisinde çözündürülerek Lowry B çözeltisi hazırlanmıştır. Sonrasında Lowry A ve Lowry B çözeltileri, 50:1 (v/v) oranında homojen olarak karıştırılarak Lowry C çözeltisi elde edilmiştir. Analiz için, ekstraktlar Lowry C ve Folin reaktifi ile muamele edilmiş, 30 dk karanlıkta bekletilmiş, absorbansları 750 nm'de spektrofotometrik (Optizen 3220UV, Mecays, Güney Kore) olarak belirlenmiştir. 10-500 mg GAE (Gallik asit eşdeğeri) L<sup>-1</sup> aralığındaki standart gallik asit çözeltiler ile hazırlanan  $y=0.006x-0.0055$  ( $R^2=0.9996$ ) kalibrasyon eğrisinden faydalanarak hesaplamalar yapılmış, sonuçlar mg GAE mL<sup>-1</sup> olarak ifade edilmiştir. TFB verileri, üçlü analiz sonucunun ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

### Fenolik bileşenlerin % biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi

Kahve örneklerinin fenoliklerinin % biyoerişilebilirliği Anson ve ark. (2009)'na göre hesaplanmıştır (Eşitlik 1). Hesaplamaya göre % biyoerişilebilirlik, toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite analizi sonuçlarına göre elde edilen; biyoerişilebilir fenolik fraksiyonların, ekstrakte edilebilir ve hidrolize edilebilir fenolik fraksiyonlarının toplamına oranının, '%' olarak ifadesidir.

$$\% \text{ Biyoerişilebilirlik: } \frac{\text{BFF}}{\text{EFF}+\text{HFF}} \times 100 \quad (1)$$

EFF: Ekstrakte edilebilir fenolik fraksiyonu; HFF: Hidrolize edilebilir fenolik fraksiyonu; BFF: Biyoerişilebilir fenolik fraksiyonu

### İstatistiksel analizler

Kahve örneklerine ait analiz sonuçlardan elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS Versiyon 22 (SPSS Statistical Analysis Software, IBM, Newyork, Amerika Birleşik Devletleri) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir veri seti için (Kahve içeceği seti) öncelikle normallik dağılımına değerlendirilmiş (Oneway Anova, Levene); homojenlik gösteren değerler Bonferroni Yöntemi, homojenlik göstermeyen değerler ise Welch-Test kullanılarak % 95 güven aralığında analiz sonuçları arasındaki farkların anlamlılığı değerlendirilmiştir ( $P<0.05$ ).

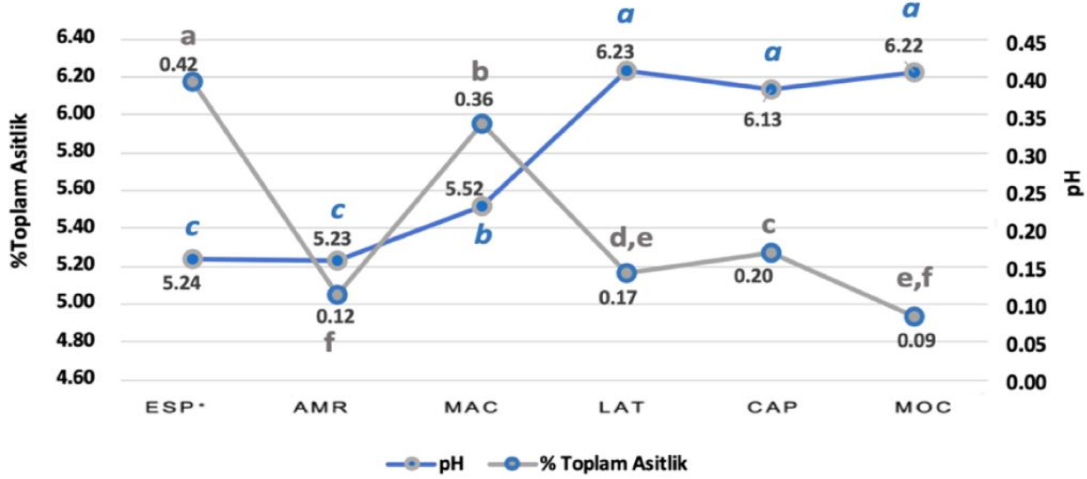
## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Fiziko-kimyasal Değerlendirmeler

Kahvenin asit içeriği; kahvenin aromasını, lezzetini ve biyoaktif bileşenlerinin içeriğini belirleyen önemli bir unsurdur. Klorojenik asit, kahvenin acılığından sorumlu olup kahvenin asitliğini oluşturan ana bileşendir ve kahvenin kavrulma prosesi sırasında fenolik bileşenlerinin dekompozisyonunu sağlamaktadır (Moon ve ark., 2009). Kahvenin asitlik özelliğinden sitrik, malik, kinik, süksinik ve glukonik asit gibi suda çözünür özelliğe sahip düşük moleküler ağırlıklı birçok bileşik sorumludur (Rao ve Fuller, 2018). Çalışma kapsamında analiz edilen örneklere ait % toplam asitlik ve pH değerleri Şekil 1'de verilmiştir ( $P<0.05$ ). Kahve örnekleri incelendiğinde; asitlik özelliği en yüksek olan örnek *Espresso* olarak belirlenmiştir. Örneklerin pH değerleri ise 5.23 ile 6.23 arasında değişirken, % toplam asitlik değerleri % 0.09 ve 0.42 arasında değişim göstermiştir.

İnek sütünün pH değeri genellikle 6.60-6.90 arasında değişmekte olup inek sütü ilavesi ile hazırlanan *Macchiato*, *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha* kahve örneklerinin pH değerlerinin 6.13 ve 6.23 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Maier ve ark. (1983), kahvenin acılık algısında pH değerlerinin, titre edilebilir asitlik değerine göre acı tat ile daha iyi bir korelasyon sağladığını ifade etmiştir. Rao ve

Fuller (2018) ise; Brezilya, Etiyopya, Kolombiya, Myanmar ve Meksika olmak üzere farklı bölgelerden elde ettikleri kahve çekirdeklerini sıcak ve soğuk demleme metotlarına göre hazırlayarak örneklerin asitlik değerleri ile antioksidan kapasiteleri ve kafeoilkinik asit izomerleri içeriği arasında ilişkiyi incelemiştir. Hafif kavrulmuş kahve çekirdeklerini demleyerek yaptıkları hazırlama sonrasında, kahve örneklerinin pH değerlerinin 4.85-5.10 arasında değiştiğini belirlemiş ve ayrıca örneklere ait yüksek pH değerini, yüksek Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK<sub>ABTS</sub>) ile ilişkilendirmiştir. Aynı çalışmada diğer literatürlerle de uyumlu bir şekilde; kafeoilkinik içeriğinin, antioksidan aktivite ve düşük pH içeriği ile uyumluluk gösterdiği ifade edilmiştir.



Şekil 1. Kahve içecekleri % toplam asitlik ve pH değerleri

\*ESP: Espresso; AMR: Americano; MAC: Macchiato; LAT: Latte; CAP: Cappuccino; MOC: Mocha

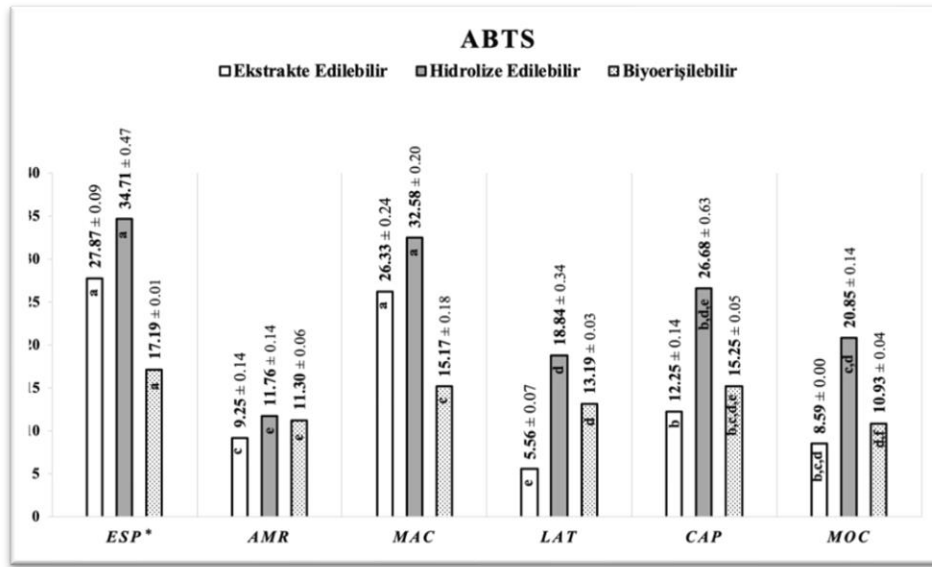
\*\* Değerler grafikte ortalama olarak verilmiş olup, farklı harflerle (a-f) ifade edilen pH ve toplam asitlik değerleri istatistiksel olarak önemli ölçüde farklıdır (P<0.05)

### Antioksidan kapasite ve toplam fenolik bileşen içeriği

Kahve içeceğinin hazırlanmasında tercih edilen demleme yöntemi; kavrulmuş-öğütülmüş kahve taneciklerinin su ile temasının kahve ekstraksiyonunda etkili olması nedeniyle; elde edilecek içeceğin antioksidatif potansiyelini belirleyen önemli bir aşamadır. Kullanılan demleme yönteminin yanı sıra kahve hazırlanırken kullanılan suyun sıcaklığı, basıncı, kahve/su oranı gibi demleme koşulları da etkilidir (Pérez-Martínez ve ark., 2010). Çalışmamızda, Espresso shot bazı ile hazırlanan kahve içeceklerinin, Espresso shot tüm örneklerde sabit olarak, hazırlama reçetelerine göre farklı oranlarda su, süt, süt köpüğü ve çikolata şurubu içeriğinin tüketimi gerçekleştirilen içeceklerin biyoaktif potansiyeline olan etkisi değerlendirilmiştir. Kahve örneklerine ait antioksidan kapasite (TEAK<sub>ABTS</sub> ve TEAK<sub>DPPH</sub>) ve TFB analiz sonuçları Şekil 2-4'de verilmiştir (P<0.05). Örnekler içerisinde bulunan kahve miktarları Espresso shot açısından değerlendirildiğinde, Espresso örneği en yoğun kahve içeren örnek olup, onu Espresso üzerine süt köpüğü ilave edilerek hazırlanan Macchiato takip etmektedir. Latte, Cappuccino ve Mocha üçlüsü incelendiğinde; Latte ve Cappuccino birim hacimde aynı orandan süt içermekte olup, Cappuccino'ya ilave edilen sütün yarısı buhar ile muamele edilmek suretiyle süt köpüğü haline getirilerek eklenmektedir. Bu nedenle Cappuccino bileşimindeki süt miktarının yarısı ısıyla nispeten daha fazla muamele edilmiştir. Mocha ise, Latte ile eş miktarda süt içermesinin yanı sıra çikolata şurubu içeriğine (15 mL) sahip olarak hazırlanmıştır. Americano ise Espresso'nun sıcak su ile seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

Tüm analiz sonuçlar bir arada incelendiğinde; oransal içerik olarak kahve miktarları yakın olan Espresso ve Macchiato'nun antioksidan kapasite ve TFB verileri istatistiksel olarak benzerlik gösterirken; Latte, Mocha ve Cappuccino ise üçlü grup olarak benzerlik göstermiştir (P<0.05, Şekil 2-

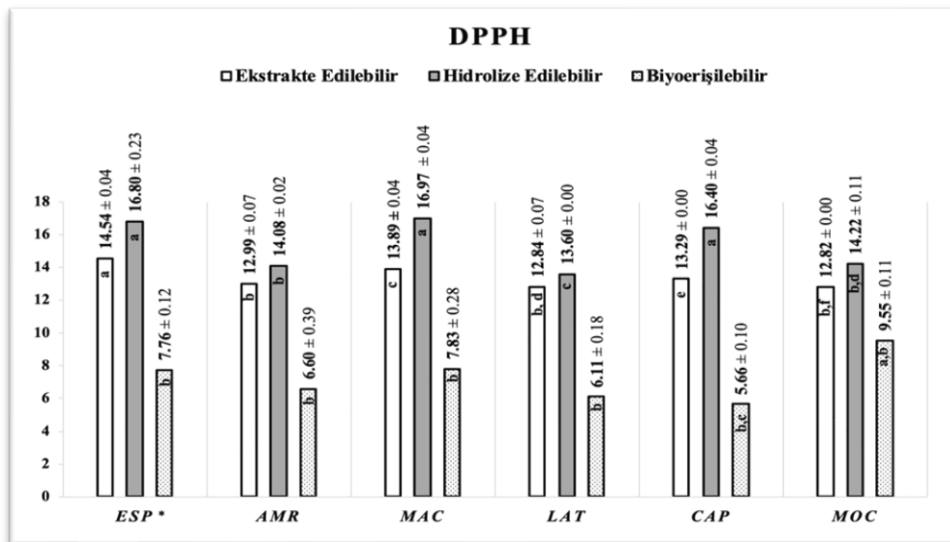
4). *Americano* ise; kahve içeriği birim hacimde en az olan örnek olarak diğer kahve içeceklerine kıyasla en düşük değerleri göstermiştir (Şekil 2-4). Tercih edilen metotlar değerlendirildiğinde; TEAK<sub>ABTS</sub> ve TFB miktarı analizlerine göre örnekler benzer biyoaktif potansiyel deseni göstermekte olup, TEAK<sub>DPPH</sub>'e göre daha iyi bir değerlendirme imkânı sunmuştur. Biyoerişilebilir fenolik fraksiyonları incelendiğinde ise; TEAK<sub>DPPH</sub> ve TFB analizlerine göre *Macchiato* ve *Espresso* yakın değerler göstermiştir (TEAK<sub>DPPH</sub>: *Espresso*: 7.83  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$ , *Macchiato* 7.76  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$ ; TFB: *Espresso*: 87.43mg GAE  $\text{mL}^{-1}$ , *Macchiato*: 82.89 mg GAE  $\text{mL}^{-1}$ ). *Latte*, *Mocha* ve *Cappuccino* üçlüsü ise; biyoaktif potansiyel olarak *Cappuccino*, *Mocha*, *Latte* olarak sıralanmış; biyoaktif potansiyel üzerinde süt köpüğünün sıcak süte göre daha etkili olduğu, çikolata şurubunun ise azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 2. Kahve içecekleri fenolik bileşenlerinin TEAK<sub>ABTS</sub> değerleri

\*ESP: Espresso; AMR: Americano; MAC: Macchiato; LAT: Latte; CAP: Cappuccino; MOC: Mocha

\*\*Bar grafikler ile temsil edilen değerler ort±ss  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$  olarak verilmiş olup, farklı harflerle (a-f) ifade edilen ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonlar istatistiksel olarak önemli ölçüde farklıdır (P<0.05)

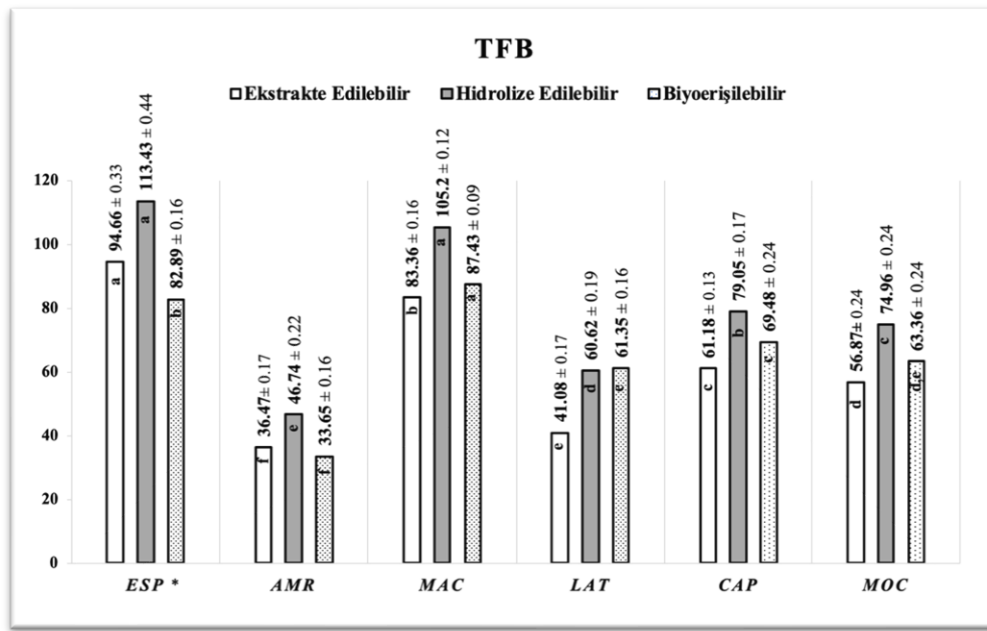


Şekil 3. Kahve içecekleri fenolik bileşenlerinin TEAK<sub>DPPH</sub> değerleri

\*ESP: Espresso; AMR: Americano; MAC: Macchiato; LAT: Latte; CAP: Cappuccino; MOC: Mocha

\*\*Bar grafikler ile temsil edilen değerler ort±ss  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$  olarak verilmiş olup, farklı harflerle (a-f) ifade edilen ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonlar istatistiksel olarak önemli ölçüde farklıdır (P<0.05)





**Şekil 4.** Kahve içecekleri fenolik bileşenlerinin toplam fenolik bileşen değerleri

\*ESP: Espresso; AMR: Americano; MAC: Macchiato; LAT: Latte; CAP: Cappuccino; MOC: Mocha

\*\*Bar grafikler ile temsil edilen değerler ort±ss mg GAE mL<sup>-1</sup> olarak verilmiş olup, farklı harflerle (a-f) ifade edilen ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik fraksiyonlar istatistiksel olarak önemli ölçüde farklıdır (P<0.05)

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm metotlara göre en yüksek değerler kahve örneklerinin hazırlanmasında baz olarak kullanılan *Espresso* örneğinde belirlenmiştir. TEAK<sub>ABTS</sub> sonuçlarına göre *Espresso* ekstrakte edilebilir fenolik bileşen fraksiyonları 28.15±0.09  $\mu\text{mol}$  Troloks mL<sup>-1</sup> olarak belirlenirken, hidrolize edilebilir fenolik fraksiyonları 35.04±0.14  $\mu\text{mol}$  Troloks mL<sup>-1</sup> ve biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonları ise 30.28±0.08  $\mu\text{mol}$  Troloks mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. TEAK<sub>DPPH</sub> sonuçlarına göre ise ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonları sırası ile 14.69±0.04, 17.98±0.02, 9.84±0.00  $\mu\text{mol}$  Troloks mL<sup>-1</sup> belirlenmiştir. Hidrolize edilebilir fenolik bileşen fraksiyonları, ekstrakte edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonlarına göre daha yüksek değerler göstermesi, ekstraksiyon prosedürüne göre daha uzun süre daha yüksek sıcaklığa maruz kalması ile ilişkilendirilebilir. Kahve örneklerinde baz olarak kullanılan *Espresso*'ya buhar ile süt köpüğü haline getirilerek ya da ısıtılarak ilave edilen süt, antioksidan kapasite değerlerinde düşüşe sebep olmuştur. *Espresso*'yu, kahve miktarında olduğu gibi *Macchiato* takip etmektedir. *Latte*, *Cappuccino* ve *Mocha* üçlüsünde yapılan antioksidan kapasite ve TFB analizlerine göre; biyoaktif potansiyel olarak *Cappuccino*, *Latte*, *Mocha* sıralaması gözlemlenmiştir. Hazırlanış farklılıkları göze önünde bulundurulduğunda; sütün köpürtülmesi, ısıtılarak eklenmesine göre artırıcı etki gösterirken (*Latte-Cappuccino*); çikolata şurubu eklenerek hazırlanan *Mocha*, kahve miktarı nispeten daha fazla olmasına rağmen, *Latte*'den daha düşük değerler göstermiştir. *Espresso* ve *Americano*'ya kıyasla, kahve içeceklerindeki süt miktarı artışı ile antioksidan kapasite değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. Toplam asitlik ve pH değerleri incelendiğinde de örnekler arasında benzer davranış deseni gözlemlenmiştir.

TFB analizi sonuçlarına göre kahve örneklerinin hidrolize edilebilir, biyoerişilebilir ve ekstrakte edilebilir fraksiyonları sırası ile 48.49-95.61, 22.21-46.89, 10.48-22.97 mg GAE mL<sup>-1</sup> aralığında değerler göstermiş olup en yüksek değerler *Espresso* ve *Macchiato* örneklerinde belirlenmiştir. Örnekler kendi aralarında, antioksidan kapasite analiz sonuçlarına benzer biyoaktif potansiyel göstermiş olup, süt miktarı artışının, TFB değerlerinde düşüşe sebep olduğu; en yüksek TFB değerinin, en yoğun kahve içeriğine sahip olan *Espresso* örneğinde belirlendiği gözlemlenmiştir. Hidrolize edilebilir

fenolik bileşikler en yüksek değerleri gösterirken, antioksidan kapasite analizlerine göre farklı olarak biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonları, ekstrakte edilebilir fenolik bileşen ekstraksiyonlardan daha yüksektir. Metodolojik farklılıklar değerlerdeki farklılığın temel sebebi olarak görülmektedir. Folin-Ciocalteu metodu, TFB içeriğinin belirlenmesinde kullanılan ve bilinen bir yöntemdir. Folin-Ciocalteu metodu başlangıçta proteinlerde fenolik amino asitlerden (triptofan, tirozinden vb.) yararlanılan protein analizi için tasarlanmış olup (Folin ve Ciocalteu 1927) analiz prensibi;  $Mo^{6+}$  iyonunun, alkali ortamda fenolik antioksidanlardan bir elektron alınarak  $Mo^{5+}$  'e indirgemesine dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu ajanı; sütün lipid fazında radikal süpürücüler olarak kabul edilen vitamin (örn. C ve E vitaminleri), peptit ve karotenoid gibi bileşikleri de indirgeyebilmekte (Shahidi ve Zhong 2015), analiz belirlenici özelliği olan mavi bir rengin oluşmasına neden olmaktadır (Sanchez-Rangel ve ark., 2013). Bu da TFB değerlerinin nispeten daha yüksek olma durumunu açıklamaktadır.

Süt proteinlerinin fenoliklerin baskınlığı nedeniyle süt ilavesinin polifenol içeriğinde ve dolayısıyla kahve antioksidan kapasitesinde önemli bir azalmaya neden olduğunu önceki çalışmalar göstermiştir (Niseteo ve ark., 2012). Kahve polifenollerinin antioksidan özellikleri ve biyoyararlanımının; süt bileşenleri, özellikle de süt proteinleri ile olası etkileşimlerden etkilenebileceğini belirlenmiştir (Quan ve ark., 2020). Sanchez-Gonzalez ve ark. (2005) İtalyan tarzı, filtre ve *Espresso* olarak 3 farklı şekilde demlenmiş kahve örneklerine farklı miktarda süt ilavesi ile beraber süt miktarı ile orantılı olarak örneklerin antioksidan kapasitesinin azaldığını belirlemiştir. Kahve polifenollerini, süt proteinleri ve diğer bileşenlerin yapısal özelliklerinin yanı sıra sıcaklık ve pH gibi diğer bazı koşullar da bağlama kuvvetlerini etkileyebilen ve dolayısıyla biyoaktif potansiyellerin değişmesine neden olan önemli faktörlerdir (Rashidinejad ve ark., 2021). Klorojenik asit ve türevlerinin kahvedeki başlıca antioksidanlar olması sebebi ile, kahve içeceklerinin antioksidan kapasitesinin birincil göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Niseteo ve ark., 2012). Süt proteinleri ve kahve fenolikleri arasındaki olası ana etkileşim, kovalent bağlanma ile gerçekleşmekte olup esas olarak bunların kovalent etkileşimleri ve tiyol-disülfid değişimleri nedeniyle oluşmaktadır (Ali ve ark., 2013).

Niseteo ve ark. (2012) çalışmalarında, farklı demleme yöntemlerinin kahve örneklerinin fenolik bileşik, kafein ve klorojenik asit türevlerinin içeriğinin yanı sıra antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sütün, kahvenin biyoaktif bileşenlerinin içeriği üzerindeki etkisini incelemek için ise *Macchiato* ve *Latte* örneklerini analiz etmiştir. TFB analizine göre, süt ilave edilmeden hazırlanan kahve örnekleri, süt ilave edilen örneklere kıyasla, daha yüksek değerler göstermiştir ve araştırmacılar süt ilavesi ile kaynaklanan azalmayı polifenollerin polifenol-protein kompleksleri oluşturma eğilimi ile ilişkilendirmiştir. Sharma ve ark. (2008) sütün inhibitör etkisinin, polifenollerin kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla süt kazeinlerine bağlanmasıyla ilgili olabileceğini ifade etmiştir. Bu etkileşimler, bir proteine bağlı birden çok polifenol veya bir polifenole bir veya daha fazla proteinin, birden fazla bölgesine bağlanması ile de gerçekleşebilmektedir. İki farklı mekanizma da proteinin çökmesini ve bağlanan polifenollerin çözelti içindeki serbest oksidanlar ile etkileşimini sınırlandırmakta, bu yolla kahve içeceklerinin de antioksidan kapasitesinde düşüşe neden olmaktadır. Protein-polifenol afinitesinin polifenol tipine, çözünürlüğüne, moleküler boşluğa, ağırlığa ve glikosilat, hidroksilat ve metilat fonksiyonel gruplarının varlığına güçlü bir şekilde bağlı olduğu belirtilmektedir (Yıldırım-Elikoglu ve Erdem 2018). Kazeinlere ek olarak, peynir altı suyu proteinleri (özellikle  $\beta$ -laktoglobulin) de kahve polifenollerini etkileşime girebilir. Polifenollerin,  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbüminin serbest sistein grupları ile etkileşime girebilmektedir (Yıldırım-Elikoglu ve Erdem, 2018). Li ve ark. (2020) çalışmalarında  $\beta$ -kazeine karşı bağlanma afiniteleri incelenen altı farklı

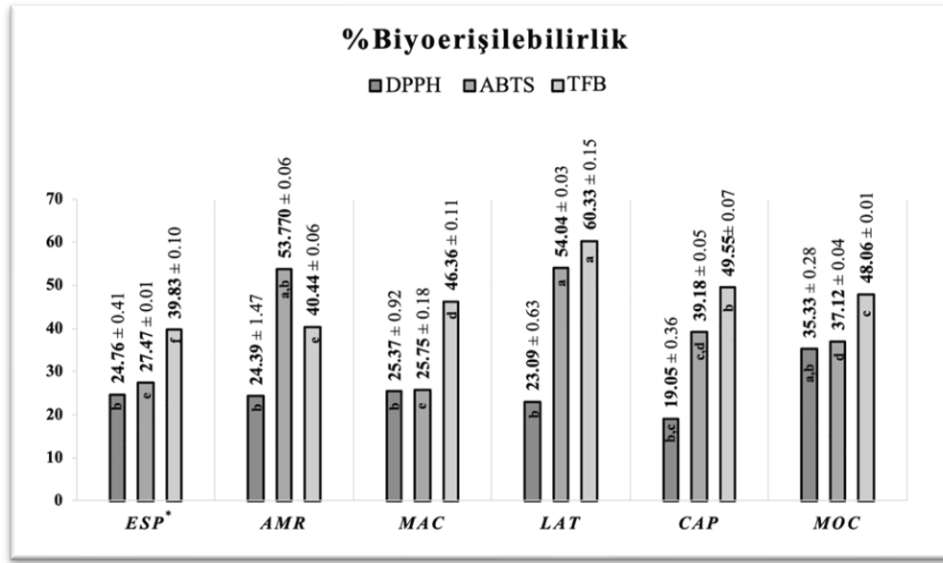
fenolik bileşikten kafeik asidin en yüksek afiniteye sahip olduğunu belirlemiş, kafeik asidi klorojenik asidin izlediğini ifade etmiş ve fenolik asitlerin tip, metilasyon, hidroksilasyon ve sterik engel gibi yapısal özelliklerinin  $\beta$ -kazeine bağlanma afinitelerini etkilediği bildirilmiştir. Dupas ve ark. (2006) ise kahvenin antioksidan içeriğinin temelini oluşturan klorojenik asidin, miktarının üçte biri kadar süt proteini ile reaksiyona girebildiğini belirlemiştir. Bu da kahve içeriğindeki klorojenik asidin bağlanmasına bağlı olarak, antioksidan kapasitenin düşüşü ile gözlemlenmiştir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi, aktif veya komşu -OH gruplarının moleküller arası veya moleküller arası hidrojen bağlanması yoluyla değişebilmektedir (Amorati ve Valgimigli, 2012). Süt proteinlerinin yanı sıra yağ ve minerallerin kahve polifenolleri ile hidrofobik, kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler de antioksidan aktivite üzerinde önemli düzeyde maskeleyici etki göstermektedir (Dupas ve ark., 2006; Tagliazucchi ve ark., 2012; Stojadinovic ve ark., 2013). Güçlü bir şekilde meydana gelen protein-polifenol etkileşimleri, sütlü kahve içeceklerinin antioksidan potansiyelini sınırlayan faktörlerdir. Kahve içeceklerine eklenen sütün, TFB içeriğini etkilemenin yanı sıra, kahve fenolik bileşiklerinin biyoerişilebilirliğini ve biyoaktivitesini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir (Dupas ve ark., 2006; Tagliazucchi ve ark., 2012).

Kahve örneklerinin *in-vitro* ortamda, gastrik ve intestinal sindirim enzimleri ile muamele edilerek elde edilen biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonlar incelendiğinde, TEAK<sub>ABTS</sub> sonuçları 10.93-17.19  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$  arasında değerler alırken; TEAK<sub>DPPH</sub> sonuçları 5.66-9.55  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$  arasında değerler göstermiştir. Kahve içeceklerinin ekstrakte edilebilir ve hidrolize edilebilir fenolik fraksiyonlarında olduğu gibi, biyoerişilebilir fraksiyonların sonuçlarına göre süt miktarının artışı antioksidan kapasite değerlerinde düşüşe sebep olmuştur. Arts ve ark. (2002), polifenol-süt protein komplekslerinin oluşumunun, polifenollerin biyoyararlılığını ve *in-vivo* antioksidan potansiyelini azaltabileceğini öne sürerken; Yuksel ve ark. (2010) ise sütün, polifenollerinin antioksidan kapasitesi ve biyoyararlılığı üzerinde istatistiksel bir farklılık yaratmadığını belirlemiştir.

Biyoerişilebilir fenolik fraksiyon değerlerindeki değişkenlik, Rodriguez-Roque ve ark. (2014) tarafından, fenolik bileşenlerin gastro-intestinal sistemde asidik ve alkali koşullar altında oksidasyona, polimerizasyona veya transformasyona gösterdikleri stabilitesizlik ile ilişkilendirilmiştir. Sindirim enzimleri tarafından proteinlere ve karbonhidratlara bağlanan fenolik bileşiklerin hidrolize edilebileceğini, bu değişimden süt matrisinin etkilendiğini ve TFB içeriğinin değiştiği ifade edilmiştir. Ayrıca kahve fenoliklerinin süt yağı ile etkileşerek, sindirim sırasında misellere dahil olmalarını indüklemektedir. Böylece sindirim sırasında stabilitesizliklerini arttırdığını ve biyoerişilebilirliği arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirlenmiştir (Otemuyiwa ve ark., 2017; Alongi ve ark., 2019). *İn-vitro* ve *in-vivo* analizler, süt proteinlerinin kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerle klorojenik asitlere bağlanabileceğini doğrulayarak, kahve ve sütün eşzamanlı tüketiminin bireylerde klorojenik asitlerin emilimini baskılayabileceğini göstermiştir (Duarte ve Farah, 2011).

Kahve örneklerinin ABTS, DPPH ve TFB analiz sonuçlarına göre % biyoerişilebilirlik değerleri Şekil 5'te verilmiştir ( $P < 0.05$ ).

Örneklerin, biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonlarının potansiyelini ortaya koyan oransal değerlendirmeye göre; *Latte* örneği DPPH, ABTS ve TFB analizlerine göre sırasıyla % 23, % 54, % 60 ile en yüksek biyoerişilebilirlik değerine sahip örnek olarak belirlenmiştir. Oransal hesaplama, *Macchiato* hazırlanmasında elde edilen içeceğin biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonlarının potansiyelini ortaya koymaktadır. Kahvenin sindirimi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde ise, Podio ve ark. (2015) fenolik bileşik % 30'dan azının biyoerişilebilirliğinin olduğunu ifade etmiştir.



**Şekil 5.** Kahve içecekleri % biyoerişilebilirlik değerleri

\*ESP: Espresso; AMR: Americano; MAC: Macchiato; LAT: Latte; CAP: Cappuccino; MOC: Mocha

\*\*Bar grafikler ile temsil edilen değerler ort±ss olarak verilmiş olup, farklı harflerle (a-f) ifade edilen DPPH, ABTS ve TFB değerleri istatistiksel olarak önemli ölçüde farklıdır (P<0.05)

## SONUÇ

Çalışma kapsamında, satışı yapılmakta olan, 2. nesil kahvecilikte önemli bir yere sahip olan Espresso kahvesinin ve hazırlanmalarında Espresso'nun baz olarak kullanıldığı Americano, Macchiato, Latte, Cappuccino ve Mocha kahve içeceklerinin; ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir ve biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonlarının TEAK<sub>ABTS</sub> ve TEAK<sub>DPPH</sub> yöntemlerine göre antioksidan kapasite ve Folin-Ciocalteu metoduna göre de TFB içeriği belirlenmiş ve metotlara göre örneklerin % biyoerişilebilirlik değerleri hesaplanmıştır. Biyoerişilebilir fenolik bileşen fraksiyonları TEAK<sub>ABTS</sub>'ye göre 10.93-17.19  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$  arasında değerler alırken; TEAK<sub>DPPH</sub>'ye göre 5.66-9.15  $\mu\text{mol Troloks mL}^{-1}$  arasında değerler aldığı belirlenmiştir. Metotların % biyoerişilebilirlik değerleri incelendiğinde ise, en yüksek değerlerin Latte örneğinde, TEAK<sub>DPPH</sub>, TEAK<sub>ABTS</sub> ve TFB analizlerine göre sırasıyla % 23, % 54, % 60 olarak belirlenmiştir. Örneklerin kahve miktarı arttıkça antioksidan kapasite ve TFB değerlerin yükseldiği, süt miktarı arttıkça azaldığı; sütün buharla muamele edilmesinin ısıtılarak ilave edilmesine kıyasla nispeten artırıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu etkinin süt-kahve etkileşiminin yanı sıra ilave edilen su, süt, süt köpüğü ile seyreltilmesinin de etkisi olduğu düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın yapılması için örneklerin teminini sağlayan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan Burak Sinkiler'e ve Coffee Sinky (Bursa) ekibine teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Ali M, Homann T, Khalil M, Kruse HP, Rawel H, 2013. Milk Whey Protein Modification by Coffee-Specific Phenolics: Effect on Structural and Functional Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(28): 6911–6920.
- Alongi M, Calligaris S, Anese M, 2019. Fat Concentration and High-Pressure Homogenization Affect Chlorogenic Acid Bioaccessibility and  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Capacity of Milk-Based Coffee Beverages. Journal of Functional Foods, 58: 130–137.

- Amorati R, Valgimigli L, 2012. Modulation of the Antioxidant Activity of Phenols by Non-Covalent Interactions. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10(21): 4147–4158.
- Anson NM, Selinheimo E, Havenaar R, Aura AM, Mattila I, Lehtinen P, Bast A, Poutanen K, Haenen GR, 2009. Bioprocessing of Wheat Bran Improves In Vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14): 6148–6155.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Maryland, USA: Association of Official Analytical, Chemists International.
- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Celik SE, 2008. Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*, 160(4): 413–419.
- Arts MJ, Haenen GR, Wilms LC, Beetstra SA, Heijnen CG, Voss HP, Bast A, 2002. Interactions Between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5): 1184–1187.
- Baruönü FÖ, Örs M, 2018. İkinci Dalga Kahve Tercihini Etkileyen Faktörler: İçtiğimiz Kahveleri Tanıyor Muyuz?. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 6(4): 150–173.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, 2007. Stability of Polyphenols in Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Subjected to In Vitro Gastric and Pancreatic Digestion. *Food Chemistry*, 102(3): 865–874.
- Bouayed, J, Deußer, H, Hoffmann, L, Bohn T, 2012. Bioaccessible and Dialysable Polyphenols in Selected Apple Varieties Following In Vitro Digestion vs. Their Native Patterns. *Food Chemistry*, 131(4): 1466–1472.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT, 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25–30.
- Clifford MN, Knight S, 2004. The Cinnamoyl-Amino Acid Conjugates of Green Robusta Coffee Beans. *Food Chemistry*, 87(3): 457–463.
- Duarte GS, Farah A, 2011. Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acids' Bioavailability in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14): 7925–7931.
- Dupas CJ, Marsset-Baglieri AC, Ordonaud CS, Ducept FM, Maillard MN, 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science*, 71(3): 253–258.
- Ekbatan SS, Sleno L, Sabally K, Khairallah J, Azadi B, Rodes L, Parakash S, Donnelly DJ, Kubow S, 2016. Biotransformation of Polyphenols in a Dynamic Multistage Gastrointestinal Model. *Food Chemistry*, 204: 453–462.
- Folin O, Ciocalteu V, 1927. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2): 627–650.
- Girginol CR, 2018. Kahve Fincandan Lezzete, Oğlak Yayıncılık ve Reklamcılık Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye, 208 s. ISBN: 9789753292757.
- Hernández-Ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B, Amigo L, 2005. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 588–593.
- Kaya G, Toker S, 2019. Kahve Tüketim Alışkanlıklarının İncelenmesi: İstanbul. *Uluslararası Ekonomi Siyaset İnsan ve Toplum Bilimleri Dergisi*, 2(3): 146–164.
- Li T, Li X, Dai T, Hu P, Niu X, Liu C, Chen J, 2020. Binding Mechanism and Antioxidant Capacity of Selected Phenolic Acid- $\beta$ -casein Complexes. *Food Research International*, 129: 108802.
- Lindmark-Månsson H, Åkesson B, 2000. Antioxidative Factors in Milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1): 103–110.
- Maier HG, Balcke C, Thies FC, 1983. Die Säuren des Kaffees. VI. Abhängigkeit des Sauren Geschmacks von pH-Wert und Säuregrad. *Lebensmittelchemie Gericht Chemie*, 37: 81-83 (In German).
- McClements DJ, Xiao H, 2014. Excipient Foods: Designing Food Matrices That Improve the Oral Bioavailability of Pharmaceuticals and Nutraceuticals. *Food & Function*, 5(7): 1320–1333.

- Moon JK, Yoo HS, Shibamoto T, 2009. Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12): 5365–5369.
- Niseteo T, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Budeč M, 2012. Bioactive Composition and Antioxidant Potential of Different Commonly Consumed Coffee Brews Affected by Their Preparation Technique and Milk Addition. *Food Chemistry*, 134(4): 1870–1877.
- Otemuyiwa IO, Williams MF, Adewusi SA, 2017. Antioxidant Activity of Health Tea Infusions and Effect of Sugar and Milk on In-Vitro Availability of Phenolics in Tea, Coffee and Cocoa Drinks. *Nutrition & Food Science*.
- Pérez-Martínez M, Caemmerer B, De Peña MP, Cid C, Kroh LW, 2010. Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5): 2958–2965.
- Podio NS, López-Froilán R, Ramirez-Moreno E, Bertrand L, Baroni MV, Pérez-Rodríguez ML, Sánchez-Mata MC, Wunderlin DA, 2015. Matching In Vitro Bioaccessibility of Polyphenols and Antioxidant Capacity of Soluble Coffee by Boosted Regression Trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43): 9572–9582.
- Porrini M, Riso P, 2008. Factors Influencing the Bioavailability of Antioxidants in Foods: A Critical Appraisal.
- Prior RL, Wu X, Schaich K, 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290–4302.
- Quan W, Qie X, Chen Y, Zen M, Qin F, Chen J, He Z, 2020. Effect of Milk Addition and Processing on the Antioxidant Capacity and Phenolic Bioaccessibility of Coffee by Using an In Vitro Gastrointestinal Digestion Model. *Food Chemistry*, 308: 125598.
- Rao NZ, Fuller M, 2018. Acidity and Antioxidant Activity of Cold Brew Coffee. *Scientific Reports*, 8(1): 1–9.
- Rashidinejad A, Tarhan O, Rezaei A, Capanoglu E, Boostani S, Khoshnoudi-Nia S, Samborska K, Garavand F, Shaddel R, Akbari-Alavijeh S, Jafari SM, 2021. Addition of Milk to Coffee Beverages; the Effect on Functional, Nutritional, and Sensorial Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21.
- Rodríguez-Roque MJ, Rojas-Graü MA, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O, 2014. In Vitro Bioaccessibility of Health-Related Compounds as Affected by the Formulation of Fruit Juice-and Milk-Based Beverages. *Food Research International*, 62: 771–778.
- Sanchez-Gonzalez I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F, 2005. In Vitro Antioxidant Activity of Coffees Brewed Using Different Procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1-2): 133–139.
- Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA, 2013. The Folin-Ciocalteu Assay Revisited: Improvement of Its Specificity for Total Phenolic Content Determination. *Analytical Methods*, 5(21): 5990–5999.
- Shahidi F, Zhong Y, 2015. Measurement of Antioxidant Activity. *Journal of Functional Foods*, 18: 757–781.
- Sharma V, Kumar HV, Rao, LJM, 2008. Influence of Milk and Sugar on Antioxidant Potential of Black Tea. *Food Research International*, 41(2): 124–129.
- Stojadinovic M, Radosavljevic J, Ognjenovic J, Vesic J, Prodic I, Stanic-Vucinic D, Velickovic TC, 2013. Binding Affinity Between Dietary Polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin Negatively Correlates with the Protein Susceptibility to Digestion and Total Antioxidant Activity of Complexes Formed. *Food Chemistry*, 136(3-4): 1263–1271.
- Tagliacuzzi D, Helal A, Verzelloni E, Conte A, 2012. The Type and Concentration of Milk Increase The In Vitro Bioaccessibility of Coffee Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44): 11056–11064.
- Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MDT, 2011. Antioxidant Activity, Polyphenols, Caffeine and Melanoidins in Soluble Coffee: The Influence of Processing Conditions and Raw Material. *Food Chemistry*, 124(3): 863–868.

- Vitali D, Dragojević IV, Šebečić 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.
- Yildirim-Elikoglu S, Erdem YK, 2018. Interactions Between Milk Proteins and Polyphenols: Binding Mechanisms, Related Changes, and the Future Trends in the Dairy Industry. *Food Reviews International*, 34(7): 665–697.
- Yuksel Z, Avci E, Erdem YK, 2010. Characterization of Binding Interactions Between Green Tea Flavanoids and Milk Proteins. *Food Chemistry*, 121(2): 450–456.
- Zulueta A, Maurizi A, Frígola A, Esteve MJ, Coli R, Burini G, 2009. Antioxidant Capacity of Cow Milk, Whey and Deproteinized Milk. *International Dairy Journal*, 19(6-7): 380–385.