

ID: 44

Patlıcan (*Solanum melongena L.*) Antosiyaninleri İçeren Akıllı İndikatör Filmler Kullanılarak Alabalığın (*Oncorhynchus mykiss*) Bozulmasının İzlenmesi

Fatma Büşra Dereli, Atıf Can Seydim, Ece Söğüt

Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Süleyman Demirel Üniversitesi

Özet

Bu çalışmada evlerde ve gıda işletmelerinde atık olarak ayrılan patlıcan kabuklarından elde edilen antosiyanin ekstraktı kullanılarak pH değişimine duyarlı kitosan bazlı bir bozulma indikatörü filmi üretilmiştir. Geliştirilen filmlerin işlevi alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) örneklerinde test edilmiştir. Örnekler indikatör filmler ile birlikte ambalajlanmış ve 0-4°C'de 12 gün boyunca depolanmıştır. Depolamanın 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde raf ömrü analizleri yapılmıştır. Yeşil renkte olan indikatör film balıktaki bozulmayla doğru orantılı olarak sarı renk göstermeye başlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre patlıcan kabuğu antosiyaninleri içeren kitosan bazlı filmin balıkta bozulma indikatörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: pH indikatörü, akıllı ambalaj, alabalık, antosiyanin, kitosan, patlıcan antosiyaninleri,

Giriş

Gökkuşluğu alabalığı içerdiği mineraller, omega yağ asitleri ve yüksek protein içeriğiyle insan sağlığına oldukça faydalı bir gıda olmasının yanında hızlı bozulan gıdalar arasında yer almaktadır.

Antosiyaninler meyve, sebze ve bitkilere kendilerine özgü pembe, kırmızı, mavi ve mor tonlardaki çeşitli renkleri veren polifenolik bileşiklerdir. Antosiyaninler pH'a karşı duyarlıdır ve asit ortamında kırmızı, nötr ortamlarda mor, alkali ortamlarda ise mavi-yeşil renge sebep olurlar. Patlıcan en yüksek antosiyanin içeriğine sahip sebzelerden biridir (Gülçür Kaplan, 2019).

Akıllı ambalaj teknolojisi, gıdaların paketlenmesi andan itibaren nakliyesi ve depolama süresi boyunca gıdanın kalitesi hakkında bilgi veren sistemlerin bütünüdür (Kocaman ve Sarımehtemetoğlu, 2010).

Akıllı ambalajlar iç ve dış indikatörler sayesinde sıcaklık değişimleri, mikrobiyal bozulma ve ambalaj içi atmosfer değişimleri gibi ürünün tazeliği ve raf ömrü hakkında tüketiciye bilgi verirler (Gök vd., 2006; Özçandır ve Yetim, 2010).

Kitosan biyobozunurluğu yüksek ve toksik olmayan bir polimer olması sebebiyle balığa temas edecek olan bu indikatörün kitosandan üretilmesi uygun görülmüştür. Antosiyaninler farklı pH değerlerinde farklı renkleri yansıtması sebebiyle pH indikatörü olarak kullanılabilecek doğal pigmentlerdir. Patlıcan kabuğu birçok gıda işletmesinde gıda atığı olarak ayrılmaktadır. Patlıcan kabukları hem yüksek antosiyanin içermesi sebebiyle hem de gıda artıklarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Alabalık örnekleri geliştirilen pH indikatör filmler ile ambalajlanmış ve 0-4°C'de 12 gün boyunca depolanmıştır. 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde balıkta kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmış ve filmlerin renk değişimi ölçülmüştür. İndikatör filmlerdeki renk değişimi ve alabalıkta bozulma arasındaki bağlantı yorumlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Kitosan (C) (Sigma-Aldrich® 448877, orta molekül ağırlıklı, 200-800 Cps çözelti, 1% asetik asit, >75% deasetilasyon) Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)'den, diğer kimyasalların tümü ise analitik saflıkta olup, yine Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)'ten satın alınmıştır. Alabalık ve patlıcan örnekleri, Isparta'da faaliyet gösteren yerel bir işletmeden temin edilmiştir.

Yöntem

Antosiyaninlerin ekstraksiyonu

Antosiyaninler, patlıcan kabuğundan bazı değişikliklerle Choi ve diğ., (2017) tarafından tarif edilen yöntemle göre ekstrakte edilmiştir. Patlıcan kabukları ince bir şekilde soyulmuş ve 65°C'deki etüvde 24 saat kurutulmuştur. Kuruyan kabuklar öğütülmüş ve kullanılacağı zamana kadar uygun koşullarda saklanmıştır. 6 g kurutulmuş patlıcan kabuğu tozu, asetik asit ile pH değeri 2'ye ayarlanmış 100 ml çözücü içerisine eklenip (%50 etanol, %50 su çözeltisi) oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 24 saat boyunca ekstrakte edilmiş ve sonrasında 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda ekstraksiyona devam edilmiştir. Sonrasında ekstratlar filtre edilmiş ve film içerisinde sıvı formda kullanılmıştır.



Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarının Ve Antosiyanin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Patlıcan kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir (Singleton ve diğerleri, 1999). Tüm ekstraktların uygun dilisyonları Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) (0.2 N) ve sodyum karbonatla (% 7.5 w/v) karıştırılır ve UV-vis spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak 765 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçülür. Sonuçlar, kg örnek/mg gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir.

Ekstraktların toplam antosiyanin içeriği, pH-diferansiyel metodu ile belirlenmiştir (Giusti ve Wrolstad, 2001). Kısaca, ekstrakte edilen çözeltinin (1 mL) pH'sı, biri potasyum klorür tamponu (10 mL), pH 1.0 ve diğeri sodyum asetat tamponu (10 mL), pH 4.5 ile ayarlandıktan 15 dakika sonra, her seyreltmenin absorbansı, 510 ve 700 nm'de saf suyla doldurulmuş boş bir hücreye karşı kaydedilir.

Ekstraktların (A) absorbansı aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

Orijinal örnekteki monomerik antosiyanin konsantrasyonu, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\text{Toplam Monomerik Antosiyanin} = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{(\epsilon \times l)}$$

MW, moleküler ağırlık (siyanidin-3-glukozit için 449.2 g / mol), DF, seyreltme faktörüdür ve ϵ , molar absobanstır (siyanidin-3-glukozit için 26.900).

Film hazırlama

% 1 w/w kitosan (C), % 1 w/w sulu asetik asit çözeltisi içinde çözündürülmüştür. Ağırlıkça kitosanın %50 si oranında patlıcan kabuğu içerecek şekilde %6'lık patlıcan kabuğu ekstaraktı eklenmiş, manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Ardından kitosanın ağırlıkça % 0,20'si oranında gliserol ilave edilerek bir kitosan film çözeltisi elde edilmiştir (Sanchez-Gonzalez ve diğ., 2010). Gliserol ilavesinin ardından film çözeltisi 5 dk. süre ile karıştırılmış ve 50 g çözelti, bir Teflon® kaplı plaka ($\varnothing = 150$ mm) üzerine dökülmüş ve çevre koşullarında 48 saat kurutulmuştur. Tüm film örnekleri analizden önce bir hafta boyunca 25 ° C'de ve % 50 bağıl nemde koşullandırılmıştır.

Film örneklerinin mekanik özellikleri

Elastik modül (EM), çekme dayanımı (TS) ve kopma noktasındaki uzama (E, %), ASTM standart yöntemi D882 (ASTM, 2018) ile belirlenmiştir. Filmler (2.5 cm x 5 cm), test makinesinin film uzatma tutamaçlarına (Lloyd LR5, AMETEK, Inc, Batı Sussex, UK) yerleştirilmiş ve kopana kadar 50 mm / dak'da gerilmiştir.

Su Buharı Geçirgenliği ve Film Örneklerinin Optik Özellikleri

Film örneklerinin su buharı geçirgenliği (WVP) E96-95 gravimetrik yöntemle göre belirlenmiştir (ASTM, 2016). Tüm film numuneleri %100 bağıl neme maruz bırakılır ve geçirgenlik ölçümleri, kapları periyodik olarak (48 saat, bir 1.5 saatte bir) 25 ° C'de tartarak gerçekleştirilmiştir.

Filmlerin opasite değerleri, UV-spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak 600 nm'deki absorbans değerlerinin alınması ve ardından filmlerin kalınlık değerlerine (mm) bölünmesi ile elde edilmiştir.

Film Örneklerinin Farklı pH Değerlerindeki Renk Değişimlerinin Belirlenmesi

Filmlerin farklı pH değerlerinde (1-10) renk değişimleri, film örneklerinin farklı pH tamponları içine daldırılarak bir Minolta Chroma Metre (CR-400, Konica Minolta, Inc., Japonya) ile ölçülmüştür. Filmlerin renk ölçümü için arka plan olarak beyaz standart bir kalibrasyon plakası ($Y = 92.7, x = 0.3160, y = 0.3321$) kullanılmıştır. Tüm ölçümler üç rastgele lokasyonda yapılarak, sonuçlar CIE L *, a * ve b * olarak ifade edilmiştir.

pH indikatör filmlerin alabalık örnekleri ile paketlenmesi ve raf ömrü çalışması

Üretilen pH indikatör filmlerin etkinliklerini test etmek amacıyla Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) örnekleri kullanılmış ve üretilen filmlerin balıkta tazelik pH indikatörü olarak kullanılmıştır. Balık örnekleri vakum poşeti içine pH indikatörleri ile birlikte konulmuş ve paketlenmiştir. Film ile birlikte paketlenen balık örnekleri 0-4°C'de depolanmıştır. Depolama boyunca alabalık örneklerinde 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde mikrobiyolojik ve kimyasal analizler yapılmıştır. Örneklerdeki pH değişimi izlenmiştir. Depolama sırasında balıklarda tiyobarbütirik asit (TBA) seviyeleri takip edilmiştir (FAO, 1986). Bu süreçte ayrıca indikatördeki renk değişimi de incelenmiştir. Balık örneklerindeki pH değişimi ile mikrobiyal gelişim arasındaki korelasyonu görmek amacıyla örneklerde mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Bunun için toplam aerobik mezofilik mikroorganizmalar için PCA (Plate count agar), koliform bakteriler için VRBA (Violet Red Bile Agar) ve *Enterobacteriaceae* için VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) agarları kullanılarak mikroorganizma sayımı yapılmıştır.



pH analizi

Balığın pH değeri dijital bir pH metre kullanılarak (Lab 860, Schott Instruments, Almanya) 0, 2, 4, 6, 8, 10, ve 12. günlerde izlenmiştir. 5 g balık örneği 45 mL saf su ile (1:10 w/v) stomacher torbasında 3 dk homojenize edilmiştir. Homojenat filtre edildikten sonra pH değeri ölçülmüştür (Rastiani vd., 2019).

TBA analizi

Tiyobarbitirik asit analizi için 5 g örnek, 15 mL su ile homojenize edilmiş ardından filtre edilmiştir. Tüpe 2 mL filtrat, 4 mL trikloroasetik asit (TCA, % 20, w/v) ve 4 mL 2-tiyobarbitirik asit (TBA, 0.02 M) çözeltileri alınmış ve karıştırılmıştır. Aynı işlemler saf su içeren kör örnek için de uygulanmıştır. Tüpler vortekslendikten sonra 95°C'de 50 dk boyunca su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnekler soğutulup 3500 rpm'de 15 dk santrifüj (Nuve NF800R, Türkiye) edilmiştir.

Örneğin 532 nm'deki absorbans değeri kör örneğe karşı okunmuştur (Shimadzu, UV-1601, Tokyo, Japan).

Elde edilen sonuç, 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg malondialdehid (MDA)/kg et örneği olarak verilmiştir (Söğüt ve Seydim, 2018).

Mikrobiyolojik analizler

Depolama süresince balık örneklerindeki mikrobiyal değişim izlenmiştir. Toplam aerobik mezofilik mikroorganizmalar için PCA (Plate count agar), koliform bakteriler için VRBA (Violet Red Bile Agar) ve *Enterobacteriaceae* için VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) agarları kullanılarak mikroorganizma sayımı yapılmıştır. Balık örnekleri filtreli stomacher torbalarında homojenize edilmiş ve uygun dilüsyonlara seyreltilerek ekimler yapılmıştır. PCA için tek kat dökme yapılmış ve 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra mikroorganizma sayımı yapılmıştır. VRBA ve VRBG için çift kat dökme yapıldıktan sonra 35°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra sayımı yapılmıştır. Döküm yapılmış petri görselleri Şekil 3.2.12.1'de verilmiştir.

Araştırma Bulguları Ve Tartışma

Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Monomerik Antosiyanin Analizi Bulguları

Patlıcan kabuğundan elde edilen ekstraktlarda gerekli seyreltmeler yapılarak toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için 765 nm'de, monomerik antosiyanin miktarının belirlenmesi için 510 ve 700 nm'de spektrofotometre okumaları yapılmış ve denklemler ile sonuçlar hesaplanmıştır. Sonuç olarak patlıcan kabuğu ekstraktındaki ortalama toplam fenolik madde miktarı 1.654,05 kg örnek/mg gallik asit olarak bulunmuştur. Aynı şekilde ortalama monomerik antosiyanin miktarı 44,29 mg/100 g olarak bulunmuştur.

Film Örneklerinin Mekanik Özellikleri

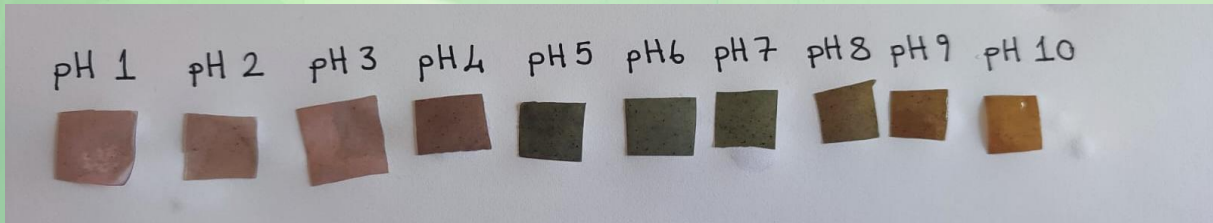
Elde edilen sonuçlara göre ortalama olarak elastik modül (EM) sonucu 774,02, çekme dayanımı (TS) sonucu 19,29 ve kopma noktasındaki uzama (E, %) sonucu 16,38 olarak bulunmuştur.

Su Buharı Geçirgenliği ve Film Örneklerinin Optik Özellikleri

Sonuçlara göre filmin ortalama su geçirgenliği değeri 10,11 iken kalınlık değeri 0,03 ve opasite değeri 2,19 bulunmuştur.

Film Örneklerinin Farklı pH Değerlerindeki Renk Değişimi Sonuçları

Üretilen indikatör filmlerin farklı pH'a sahip ortamlarda gösterdiği renk değişimini incelemek amacıyla eşit miktardaki indikatör filmler pH 1'den pH 10'a kadar olan eşit miktardaki tampon çözeltilere daldırılmıştır. Renk değişimleri aşağıdaki şekilde verilmiştir. İndikatör film pH 1-3 arası pembe-kırmızı renk alırken, pH 4-5 arasında mavi renk, pH 6-7 arası mavi-yeşil renk, pH 8-10 arası sarı renk almaktadır.



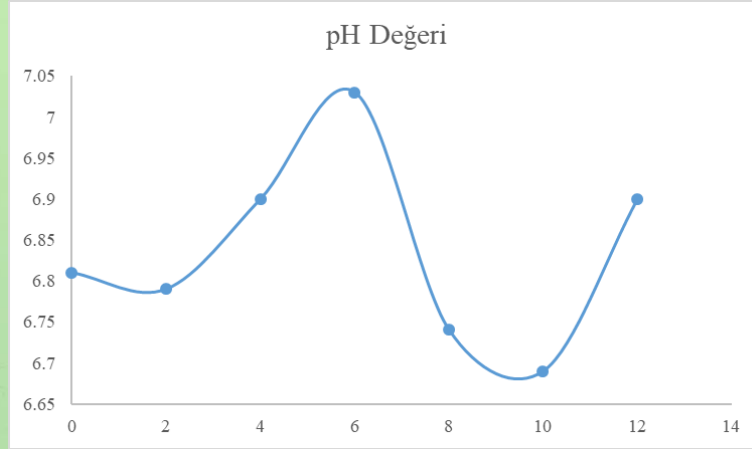
pH İndikatör Filmlerin Alabalık Örnekleri İle Paketlenmesi ve Raf Ömrü Çalışması

Alabalık örnekleri 40 g olacak şekilde ayrılmış ve indikatör filmler ile birlikte vakum poşet ile paketlenmiştir. Örnekler 12 gün boyunca 0-4°C'deki soğuk dolaplarda depolanmıştır. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12. günlerde alabalık örneklerinde kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Filmlerde ise renk değişimi izlenmiştir.



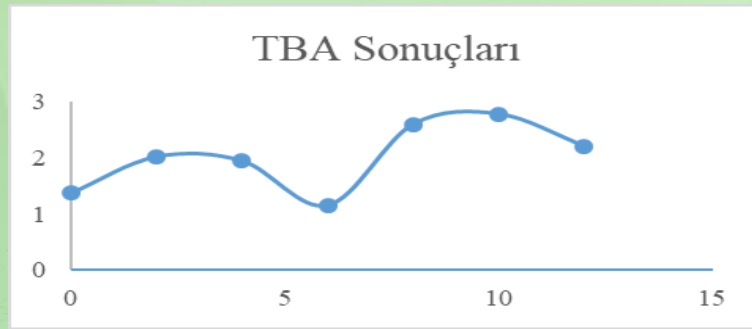
pH Analizi Sonuçları

İndikatör filmler ile paketlenen alabalıkların pH değerleri 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde analiz edilmiştir. Alabalığın pH değeri 6. güne kadar artarken 6. günden sonra düşmeye başlamış 10. günde tekrar artmıştır



TBA Analiz Sonuçları

İndikatör filmler ile paketlenen alabalıkların TBA değerleri 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde analiz edilmiştir. TBA değerleri 12 gün boyunca kabul edilebilir sınıra çıkmamıştır.

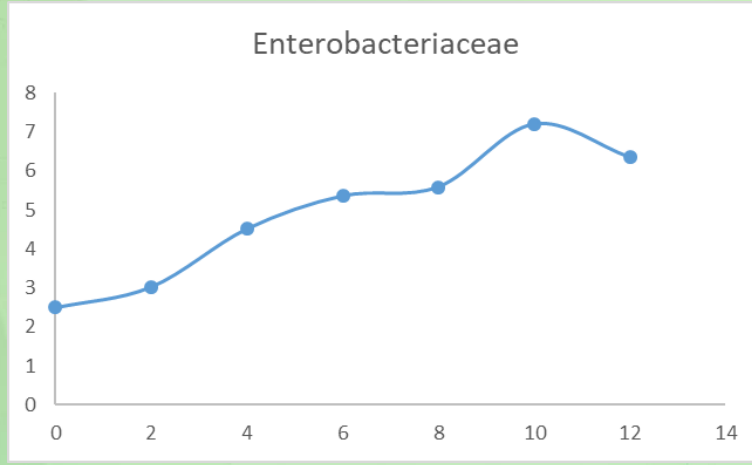
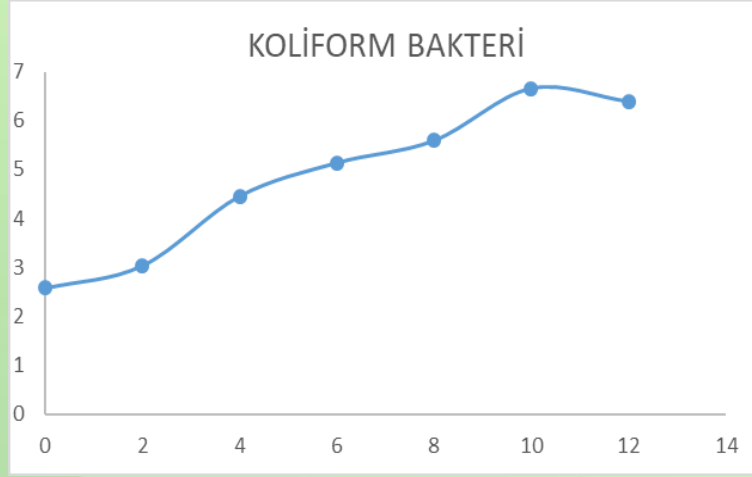


Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

İndikatör filmler ile paketlenen alabalıklarda 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerde mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Toplam aerobik mezofilik mikroorganizmalar için PCA (Plate count agar), koliform bakteriler için VRBA (Violet Red Bile Agar) ve *Enterobacteriaceae* için VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) agarları kullanılarak mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Toplam Mezofilik Aerobik Mezofilik Mikroorganizma sayısı 6. günde kabul edilebilir sınırı aşmasıyla örnek raf ömrünü tamamlamıştır.





Depolama sırasında İndikatör Filmin Renk Değişimi

Filmlerin renkleri depolama süresi boyunca 0, 2, 4, 6, 8 ve 10. günlerde CIE L* a* b* sistemiyle ölçülmüştür.



0 ve 2. günlerdeki filmlerin renk değişimi orta, 6 ve 8. günlerde filmlerin renk değişimi büyük, 2-4,4-6, 8-10 ve 10-12. günlerdeki renk farkının çok büyük olduğu saptanmıştır.



Sonuç

Patlıcan kabuklarından elde edilen antosiyaninler ile pH'a duyarlı kitosan bazlı filmler başarı ile elde edilmiştir. Geliştirilen filmler ile birlikte paketlenen alabalıkların mikrobiyal analiz sonuçları ile indikatör filmlerin renk değişimi arasında anlamlı bir ilişki kurulmuştur. Yapılan analizler sonucunda geliştirilen patlıcan kabuğu antosiyaninleri içeren kitosan bazlı filmlerin taze alabalığın raf ömrü hakkında bilgi vermesi amacıyla kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu araştırma için konu seçiminden araştırmanın yönetilmesine kadar her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren ve karşılaştığım bütün zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Atıf Can Seydim'e teşekkürlerimi sunarım.

Başta laboratuvar ve yöntem çalışmaları olmak üzere birçok konuda yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Ece Söğüt'e teşekkürlerimi sunarım.

FYL-2022-8708 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Referanslar

- ASTM. 2016. Standard test methods for water vapor transmission of materials: E96/E96M-16. In Annual book of American Society for Testing and Materials Standards (Vol. 04.06, pp. 14). West Conshohocken, PA: ASTM.
- ASTM. 2018. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting: D882. In Annual book of American Society for Testing and Materials standards (Vol. 08.01, pp. 12). West Conshohocken, PA: ASTM.
- Choi, I., Lee, Y.J., Lacroix, M., Han, J., 2017. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. Food Chemistry,, 218, 122–128, Seoul.
- Food and Agriculture Organization, FAO (1986) Food and Agriculture Organization of the United Nations: Manuals of Food Quality Control, Rome, 14, 8, 139-142.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Curr Protocol., 1.
- Gök, V., Batu, A., Telli, R., 2006. Akıllı Paketleme Teknolojisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, 45-48, Bolu
- Gülçür kaplan, B., 2019. Patlıcanda (*Solanum melongena L.*) Aşı Kombinasyonlarının Bazı Biyokimyasal Bileşikler Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Kocaman, N., Sarımehtemoğlu, B., 2010. Gıdalarda Akıllı Ambalaj Kullanımı. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 81, 2, 67-72, Ankara.
- Özçandır, S., Yetim, H., 2010. Akıllı Ambalajlama Teknolojisi ve Gıdalarda İzlenebilirlik. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5, 1, 1-11, Kayseri.
- Rastiani, F., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., Sadrabad, E.K., Mohajeri, F.A., Dehghani-Tafti, A., 2019. Monitoring the Freshness of Rainbow Trout Using Intelligent PH-sensitive Indicator During Storage. Journal of Nutrition and Food Security, 4, 4, 225-235.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2010. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. Carbohydr Polym., 822, 277–283, Valencia.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuella-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method Enzymol., 299, 152-178.
- Söğüt, E., Seydim, A.C., 2018. The effects of Chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. Food Packaging and Shelf Life, 18, 13–20.

