J Food Health Sci

Vol. 1 Issue 2 2015 E-ISSN 2149-0473

Journal of Food and Health Science

ScientificWebJournals
(SWJ)

Journal of Food and Health Science

E- ISSN 2149-0473

Journal abbreviation: **J Food Health Sci**

is published in one volume of four issues per year by

www.ScientificWebJournals.com

Contact e-mail: jfhs@scientificwebjournals.com and ozkanozden@scientificwebjournals.com

Aims and Scope

"Journal of Food and Health Science" publishes peer-reviewed articles that cover all aspects of **food** and **health science** in the form of review articles, original articles, and short communications. Peer-reviewed (**with two blind reviewers**) open access journal published quarterly articles in English or Turkish language.

General topics for publication include, but are not limited to the following fields:

- Food Science/Technology
- Food Chemistry/Microbiology
- Food Packaging/Packaging Materials/Migration
- Food Safety/Hygiene/Quality Assurance/Control
- Hazard/Risk Detection/Analysis/Management/Manufacturing Practices
- Genetically Modified Food
- Functional Foods/Dietary Supplements/
- Nutrition and Child Development/ Nutrition in Pregnancy/ Nutrition and Age/ Nutrition and Cancer/Nutrition and Chronic Diseas /
- Food Allergen/Chemical Contaminants
- Population and Demographic transitions in Nutrition/Social Determinants of Nutrition
- Nutrient Data/Bioavailability/Trace Elements/
- Human Nutrition and Health Sciences/Epidemiology/Micronutrients
- Energy/Metabolism/Physical Activity/Exercise/Sport Nutrition
- Public Health/Diet Selection/Obesity/Food Poisoning and Outbreaks/ Therapies/
- Public Health Governance/Food Security/Nutrition Policies
- Clinical Nutrition

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

Journal abbreviation: **J Food Health Sci**

Vol. 1 Issue 2 Page 67-108 (2015)

Table of Contents/İçerik

1(2): 67-74 (2015) doi: 10.3153/JFHS15006

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

ORIGINAL ARTICLE/ORİJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER TAM MAKALE

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ROYAL JELLY AND RAPE HONEY AGAINST *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7965)

Deyan STRATEV[1], Ivan VASHIN[1], Ralitsa BALKANSKA[2], Dinko DINKOV[1]

[1] Department of Food Hygiene and Control, Veterinary Legislation and Management, Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Stara Zagora, Bulgaria

[2] Department of Special Branches - Bees, Institute of Animal Science, Kostinbrod, Bulgaria

Received: 09.01.2015

Accepted: 26.01.2015

Published online: 02.02.2015

Corresponding author:

Deyan STRATEV, Department of Food Hygiene and Control, Veterinary Legislation and Management, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University 6000 Stara Zagora, Bulgaria

E-mail: deyan.stratev@trakia-uni.bg

Abstract:

Different solutions of royal jelly, royal jelly and rape honey mix, and rape honey (2, 5, 10, 20, and 30%) were contaminated with bacterial suspension of *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7965). Colony counts for each test substances were determined after incubation for 24 h and 48 h and those concentrations which completely inhibited the growth of the test strain were assigned as Real Bactericidal Concentration (RBC) or 100% inhibition. Royal jelly and rape honey mixes possessed a lower antibacterial activity than rape honey. The concentrations of royal jelly (10, 20, and 30%) had a total inhibitory effect against *A. hydrophila* (ATCC 7965). Royal jelly, royal jelly and rape honey mix, and rape honey have a potential as alternative therapeutic agents against *A. hydrophila*.

Keywords:

Royal jelly, Rape honey, Antibacterial activity, *Aeromonas hydrophila*

Introduction

The hypopharyngeal glands of the honey bee (*Apis mellifera* L.) produce royal jelly (RJ) that is essential to feed and raise broods and queens (Li et al., 2010). Several positive effects of RJ are reported: immune system stimulation, activation of the vegetative and central nervous systems etc. The main RJ acid 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) is known to have a high antimicrobial effect (Blum et al., 1959; Melliou and Chinou, 2005). Research data suggest that the 10-HDA found in RJ may inhibit the vascularization of tumors (Izuta et al., 2009). The antibacterial activity of the peptide Royalisin against Gram-positive bacteria has been known since 1990 (Fujiwara et al., 1990; Shen et al., 2010). On the other hand, RJ may cause allergic reactions in humans, asthma, fatal anaphylaxis, thus this product remains non-approved for use in most countries (Leung et al., 1997; Lombardi et al., 1998; Takahama and Shimazu, 2006).

In many studies for detection of antibacterial activities of honey, the agar well diffusion method was used (Al Jabri et al., 2005). The results of agar well diffusion method must be interpreted using clear criteria. Some authors measure the clear zone around the well, and express the activity in equivalent phenol concentrations (Baltrusaityte et al., 2007).

Standard methods required for microbiological testing of pathogens in foods use incubation that makes objective detection of pathogens. Only live microbial cells could survive and form colonies. This is the principle at the background of microbiological testing of foods in Europe (Anonymous, 2007). We have used these arguments to investigate a new methodology for antibacterial activity testing (Stratev et al., 2012).

A. hydrophila strains associated with human gastroenteritis are capable to grow in foods at refrigeration temperatures, currently considered adequate for preventing the growth of foodborne pathogens (Palumbo et al., 1985). Other authors reported wound infections in humans caused by *A. hydrophila* (Campbell, 2001; Hiransuthikul et al., 2005).

The use of antibiotics is the main treatment to control bacterial illness, and this results in development of resistant bacteria (Castro et al., 2008). In available references we did not find studies on the antibacterial activity of royal jelly, rape honey, and royal jelly and rape honey mix against *A. hydrophila* (ATCC 7965). Thus, the aim of this study was to determine the Real Bactericidal Concentration (RBC) or 100% inhibition of royal jelly, royal jelly and rape honey mix, and rape honey (2, 5, 10, 20, and 30%) against *A. hydrophila* (ATCC 7965) by means of a microbiological method.

Materials and Methods

Test substances

The tested rape bee honey (H) samples were obtained from beekeepers owning many hives (from 50 to 210), immediately after the flowering of rape (the centrifugation of honey was performed in June) in different regions of Stara Zagora district, Bulgaria. During the honey collection period bees were not supplemented with carbohydrate syrups or treated with antimicrobial drugs. Until the analysis, samples were kept at refrigerator conditions (0-4°C). Water content, pH, free acidity, electrical conductivity, diastase and invertase activity, specific optical activity and hydroxymethylfurfurol (HMF) content were assayed as per the harmonized methods of the European honey commission (Bogdanov et al., 1997). The botanical origin of the samples was established by their melissopalynological, organoleptic, physical and chemical characteristics (Oddo et al., 2004; von der Ohe et al., 2004). All data referring to physical and chemical parameters of rape honey were statistically processed by the Student's t-test and presented as mean and standard deviation (SD) (Table 1).

Royal jelly (J) (n=6) used in the study was pipetted directly from queens cells. The following parameters of samples were determined: sugars (fructose, glucose, sucrose by HPLC after Sesta (2006); proteins by Folin-Ciocalteu reagent; water content by refractometry; dry matter of the sample by subtracting the water content from 100; pH values – potentiometrically by pH meter Mi 150 (1% water solution of royal jelly); total acidity by titration with 0.1 N NaOH according to ON 2576693-84 about fresh and lyophilized royal jelly; electrical conductivity of 1 % water solution of royal jelly by conductometry (Bogdanov et al., 1997; Balkanska et al., 2012) (Table 2).

For some authors only the storage of royal jelly in a frozen state could prevent the decomposition of biologically active proteins and thus, royal jelly should be frozen as soon as it is harvested (Li et al., 2007). For our experiments royal jelly was stored prior to analyses in a dark bottle in freezing conditions (-20°C).

To avoid the acid taste and allergic reactions after consumption of royal jelly, many producers recommend mixing of this product with honey, mainly in proportion 1:100 (JH). Solutions containing 2, 5, 10, 20, and 30% of each test substances were prepared in sterile Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Darmstadt, Germany). To prevent photodegradation of glucose oxidase, associated with antimicrobial activity in honey (Bogdanov et al., 1997) all test substances were stored in the dark and dilutions were prepared immediately prior to testing (Sherlock et al., 2010).

Microbiological assay

In this study the reference strain of *A. hydrophila* (ATCC 7965) provided by the National bank for industrial microorganisms and cell cultures (Sofia) was used. Prior to experiments the microorganism was incubated for 24 h at 28°C in Brain heart infusion broth (Merck, Darmstadt, Germany). Petri dishes with about 15 ml blood agar were inoculated with a loopfull of 24 h broth culture and incubated for 24 h at 28°C. Three or four morphologically similar colonies were taken from the agar and suspended in 5 ml sterile physiological solution for preparation of bacterial suspension adjusted to the 0.5 McFarland standard (1.5 x 10^8 CFU/ml). From the initial suspension decimal dilutions (to 5^{-th}) to 10^{-3} in 9 ml sterile TSB (Merck, Darmstadt, Germany) were made.

For detection of exact *A. hydrophila* (ATCC 7965) counts Petri dishes with approximately 15 ml MacConkey agar (Merck, Darmstadt, Germany) were inoculated with 0.1 mL of the 5^{th} dilution of the initial bacterial suspension in TSB and incubated for 24 h and 48 h at 28°C. By running this parallel microbiological assay it was found out that in positive control (0.3 mL for diluted (10^{-5}) test bacterial suspension in 5.7 mL TSB) the counts of live *A. hydrophila* (ATCC 7965) cells used for contamination dilution from bacterial suspension in TSB (10^{-5} dilution of 0.5 McFarland standard) was log 1.61 CFU/mL.

This microbiological test was also done for all dilutions in TSB (Merck, Darmstadt, Germany) of test substances contaminated with bacterial suspension. To calculate the percent of inhibition the bacterial count in the positive control after 24 h incubation were accepted as 100% (Table 3).

The concentrations of test substances which completely inhibited the growth of *A. hydrophila* (ATCC 7965) after 24 h and 48 h incubation were assigned as Real Bactericidal Concentration (RBC) or 100% inhibition.

All experiments were done in Department of Food Hygiene and Control, Veterinary Legislation and Management, Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Stara Zagora, Bulgaria.

Results and Discussion

Rape honey has a turbid white to white colour. Immediately after centrifugation the honey consistency was semi-liquid, but within a relatively short period of time it became finely crystallized provided that the technological processing was proper. The flavour of rape honey is specific and the taste is sweet and characteristic in some instances – with a very subtle acid tinge. The pollen analysis of rape honey showed increased number of pollen grains. Their proportion exceeded 40%, i.e. rape honey could be classified as a pollen-rich honey type. In our study we have analysed the specific optical activity - a parameter that is not reported for rape honey so far. The mean specific optical activity of rape honey: (–) 12 ±0.8164 $[\alpha_D]^{20}$ is close to that of Bulgarian polyfloral honeys: (–) 14.8 ±4.9 $[\alpha_D]^{20}$ (Dinkov, 2003).

Quality parameters of Bulgarian's rape honey are comparable to those reported in the literature and in accordance with European quality standards (Bogdanov et al., 1997). pH values were lower (3.232) than data reported by Devillers et al. (2004) - 4.019 and than European rape honey from 2004 – from 3.9 to 4.1 (Piaza and Oddo, 2004) and could be related to the organoleptically established slightly acid taste (Table 1).

The antibacterial effect of honey mostly against Gram-positive bacteria is very well documented (Molan, 1992a; Molan, 1992b; Molan, 1997). The antimicrobial activity of honey is attributed largely to osmolarity, pH, hydrogen peroxide production and the presence of other phytochemical components. In vivo, such activity may occur due to a synergistic relationship between any of these components rather than a single entity (Mavric et al., 2008).

It was found that several honeys may have potential as therapeutic honeys (Wilkinson and Cavanagh, 2005).

Table 1. Quality parameters of rape honey

Quality parameters	Results	References	
		Devillers et al. (2004)	**Piaza and Oddo (2004)**
Water content (%)	X 16.8 SD ±0.2108 Min 16.6 Max 17	18.46 ±0.655 17.00 19.80	- - 14.7 21.3
	$p<0.05$		
Free acidity (meq/kg)	X 36.3 SD ±1.1595 Min 35 Max 38	10.66 ±1.318 6.510 12.30	9.4 - 22 - - - -
	$p<0.05$		
pH	X 3.232 SD ±0.01032 Min 3.22 Max 3.25	4.019 ±0.119 3.700 4.260	3.9 - 4.1 - - -
	$p<0.05$		
Conductivity (mS/cm)	X 0.128 SD ±0.00105 Min 0.127 Max 0.13	0.2031 ±0.4435 0.110 0.269	0.14 - 0.34 - - -
	$p=0.4979$		
Diastase activity (Ghote), (DN)	X 12.9 SD ±0.1051 Min 12.8 Max 13.1	26.85 ±5.911 11.20 36.80	10 - 46.6 - - -
	$p<0.05$		
Hydroxymethylfurfurol (HMF), (mg/kg)	X 14.89 SD ±0.3528 Min 14.4 Max 15.36	3.196 ±1.665 0.210 5.950	- - - -
	$p<0.05$		
Invertase activity (IN)	X 10.643 IN SD ±0.0241 Min 10.62 Max 10.69	132.9 $U.kg^{-1}$ ±33.8 (von der Ohe and von der Ohe, 1996)	77,1 $U.kg^{-1}$ - 39.7 50.7 (Krauze and Zalewski, 1991)
Specific optical rotation, $[\alpha]_D^{20}$	X (–) 12 SD ±0.8164 Min (–) 11 Max (–) 13	-	-

It was found that several honeys may have potential as therapeutic honeys (Wilkinson and Cavanagh, 2005). As the potential role of honey as a topical agent to manage surgical site or infections is increasingly acknowledged, other types of honeys need also to be assessed and evaluated (Gethin and Cowman, 2008).

Our results for royal jelly samples 4, 5 and 6 (16.84, 18.99, and 19.63 %) (Table 2) and the results of other studies showed that RJ had a high protein content (9-18%) (Sabatini et al., 2009).

In all cases, 10, 20, and 30% solutions of royal jelly showed 100% inhibition after 24 h and 48 h (RBC) incubation of *A. hydrophila* (ATCC 7965). In some cases (Samples J-1, J-3 and J-4) 100% inhibition after 24 h and 48 h (RBC) were also found with 5% royal jelly. Only 30% rape honey, and royal jelly and rape honey mix possessed a total antibacterial effect after incubation of *A. hydrophila* (ATCC 7965) for 24 h and 48 h (RBC) at 28°C. In all samples we found lower percentage of inhibition for 20% royal jelly and rape honey mix in comparison to 20% rape honey (Table 3).

L-proline was found with high concentrations in royal jelly (369-1930 μg/g) (Saito et al., 2011). It is well known that Bulgarian's blossom honeys contain 267 ±23.71 mg/kg L-proline on the average (Dinkov, 2000). The mixing of RJ and honey results in a higher content of proteins, which could lead to formation of chemical structures. With this regard Gethin and Cowman (2008) established that the interaction of hydrogen bonding between hydroxyl groups of phenolic compounds and peptide bonds of protein forms strong insoluble polyphenol-protein complex in aqueous solution and consequently, high turbidity. More investigations are necessary to prove the hypothesis that the chemical structures possessed specific antibacterial activity to different microorganisms. This could be related to lower antibacterial activity of royal jelly and rape honey mixes compared to rape honey (Table 3).

Some authors recommend testing for allergic reactions prior to clinical investigations (Leung et al., 1997; Lombardi et al., 1998; Takahama and Shimazu, 2006). In the future it is important to do additional investigations about the specific antibacterial activity of strong insoluble polyphenol-protein complexes in royal jelly and rape honey mixes for different microorganisms.

Conclusion

Royal jelly (10, 20, and 30%), rape honey (30%), and royal jelly and rape honey mix (30%) have a potential as alternative therapeutic agents against *A. hydrophila*.

Table 2. Quality parameters of royal jelly samples

No sample	Water content, %	pH	Total acidity, mL 0.1 NaOH/g	Electrical conductivity, mS/cm	Proteins, %	Fructose, %	Glucose, %	Sucrose, %
1	60.40	3.87	3.86	191	10.44	6.89	8.54	0.04
2	61.70	3.98	4.05	204	14.56	4.23	6.05	0.04
3	61.50	4.04	3.31	188	9.62	5.23	7.35	0.07
4	61.70	3.97	3.68	208	16.84	4.56	4.08	1.79
5	59.10	3.86	3.96	202	18.99	5.05	5.28	1.39
6	62.70	3.91	4.42	216	19.63	5.47	5.12	2.89

Table 3. Antibacterial activity of royal jelly (J), royal jelly and rape honey mix (JH), and rape honey (H) against *A. hydrophila* (ATCC 7965)

Test substance	% (v/v)	24 h		48 h	
		log CFU/ mL	Inhibition, % / RBC*	log CFU/ mL	Inhibition, % / RBC*
J-1	2	> 8	0	> 8	0
	5	0	100	0	RBC
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-1	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	6.90	11.43	8.22	0
	30	0	100	0	RBC
J-2	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-2	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	> 8	0	> 8	0
	30	0	100	0	RBC
J-3	2	> 8	0	> 8	0
	5	0	100	0	RBC
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-3	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	0	100	7.56	2.96
	30	0	100	0	RBC
H	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	6.30	19.13	6.54	16.15
	30	0	100	0	RBC

Test substance	% (v/v)	24 h		48 h	
		log CFU/ mL	Inhibition, % / RBC*	log CFU/ mL	Inhibition, % / RBC*
J-4	2	> 8	0	> 8	0
	5	0	100	0	RBC
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-4	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	7,58	2.7	> 8	0
	30	0	100	0	RBC
J-5	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-5	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	8.30	0	> 8	0
	30	0	100	0	RBC
J-6	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	0	100	0	RBC
	20	0	100	0	RBC
	30	0	100	0	RBC
JH-6	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	7.69	1.29	7.99	0
	30	0	100	0	RBC
H	2	> 8	0	> 8	0
	5	> 8	0	> 8	0
	10	> 8	0	> 8	0
	20	6.30	19.13	6.54	16.15
	30	0	100	0	RBC

References

Al Jabri, A.A., Al Hosni, S.A., Nzeako, B.C., Al Mahrooqi, Z.H., Nsanze H. (2005): Antibacterial activity of Omani honey alone and in combination with gentamicin. *Saudi Medical Journal*, 26(5): 767-771.

Anonymous (2007): Commission regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union*. L, 322: 12-29.

Balkanska, R., Zhelyazkova, I., Ignatova, M. (2012): Physico-chemical quality characteristics of royal jelly from three regions of Bulgaria. *Agricultural Science and Technology*, 4(3): 302-305.

Baltrusaityte, V., Venskutonis, P.R., Ceksteryte, V. (2007): Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S-aureus* and *S-epidermidis*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2): 201-208.

Blum, M.S., Novak, A.F., Taber, S. (1959): 10-Hydroxy-Δ2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science*, 130(3373): 452-453.

Bogdanov, S., Martin, P., Lullman, C. (1997): Harmonized methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, Extra Issue: 1-59.

Campbell, J.R. (2001): Infectious complications of lawn mower injuries. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(1): 60-62.

Castro, S.B.R., Leal, C.A.G., Freire, F.R., Carvalho, D.A., Oliveira, D.F., Figueiredo H.C.P. (2008): Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4): 756-760.

Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delegue, M.H., Dore, J.C. (2004): Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86(2): 305-312.

Dinkov, D. (2003): A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria. *Apidologie*, 34(3): 319-320.

Dinkov, D. (2000): A report on the Bulgarian bee honey ripeness according to amount of the aminoacid praline. *Acta Entomologica Bulgarica*, Suplement 1, 71-74.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistri*, 265(19): 11333-11337.

Gethin, G., Cowman, S. (2008): Bacteriological changes in sloughy venous leg ulcers treated with manuka honey or hydrogel: an RCT. *Journal of Wound Care*, 17(6): 241-244, 246-247.

Hiransuthikul, N., Tantisiriwat, W., Lertutsahakul, K., Vibhagool, A., Boonma, P. (2005): Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in Southern Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, 41(15): e93-e96.

Izuta, H., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. (2009): 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(4): 489-494.

Krauze, A., Zalewski, R.I. (1991): Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 192(1): 19-23.

Leung, R., Ho, A., Chan, J., Choy, D., Lai, C.K. (1997): Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clinical and Experimental Allergy*, 27(3): 333-336.

Li, J., Feng, M., Begna, D., Fang, Y., Zheng, A.J. (2010): Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly-producing worker honeybees (*Apis mellifera* L). *Journal of Proteome Research*, 9(12): 6578-6594.

Li, J., Wang, T., Peng, W.J. (2007): Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins. *Journal of Apicultural Research*, 46(2): 73-80.

Lombardi, C., Senna, G.E., Gatti, B., Feligioni, M., Riva, G., Bonadonna, P., Dama, A.R., Canonica, G.W., Passalacqua, G. (1998):

Allergic reactions to honey and royal jelly and their relationship with sensitization to compositae. *Allergologia et Immunopathologia*, 26(6): 288-290.

Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., Henle, T. (2008): Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(4): 483-489.

Melliou, E., Chinou, I. (2005): Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23): 8987-8992.

Molan, P.C. (1992a): The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity, *Bee World*, 73(1): 5-28.

Molan, P.C. (1992b): The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(2): 59-76.

Molan, P.C. (1997): Honey as an antimicrobial agent. In: Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds.),

Bee Products. Properties, Applications, and Apitherapy. Springer Science+Business Media, New York, pp. 27-37.

Oddo, L.P., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkvied, J., Martin, P., Morlot, M., Valbuena, A.O., Ruoff, K., von der Ohe, K. (2004): Botanitical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie*, 35: 82-93.

Palumbo, S.A., Morgan, D.R., Buchanan, R.T. (1985): Influence of Temperature, NaCI, and pH on the Growth of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Science*, 50: 1417-1421.

Piaza, M.G., Oddo, L.P. (2004): Bibliographical review of the main European unifloral honeys. *Apidologie*, 35: 94-111.

Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Caboni, M.F., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L.B. (2009): Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1): 16-21.

Saito, K., Kohama, J., Sakamoto, Y., Iwasaki, Y., Ito, R., Horie, M., Nakazawa, H. (2011): Determination of proline enantiomers in honey and royal jelly by LC-UV. *Journal of Aoac International*, 94(2): 482-486.

Sesta, G. (2006): Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37(1): 84-90.

Shen, L.R., Ding, M.H., Zhang, L.W., Jin, F., Zhang, W.G., Li., D. (2010): Expression of Acc-Royalisin Gene from Royal Jelly of Chinese Honeybee in *Escherichia coli* and Its Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4): 2266-2273.

Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., Humphreys, H. 2010): Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10: 47.

Stratev, D., Dinkov, D., Vashin, I. (2012): Antibacterial effect of extracts from Bulgarian's "poplar" propolis and Smoke tree (*Cotinus coggigria Scop*.) against *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7965). *Revue de Medecine Veterinaire*, 163(10): 443-447.

Takahama, H., Shimazu, T. (2006): Food-induced anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *The Journal of Dermatology*, 33(6): 424-426.

von der Ohe, W., von der Ohe, K. (1996): Charakterisierung einheimischer Rapshonige. *Deutsches Bienen Journal*, 4: 438-443.

von der Ohe, W., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004): Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35: 18-25.

Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M.A. (2005): Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Food*, 8(1): 100-103.

1(2): 75-83 (2015) doi: 10.3153/JFHS15007

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

ORIGINAL ARTICLE/ORİJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER TAM MAKALE

EFFECT OF SOLVENT ON AFLATOXIN CONTENT IN EXTRACTS OF VIRGINIA TYPE PEANUT SKINS

Paul J. SARNOSKI[1], Vanessa E. BILLINGSLEY[1], Jodie V. JOHNSON[2], Sean F. O'KEEFE[3]

[1] University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Food Science and Human Nutrition, Gainesville, Florida, U.S.A

[2] University of Florida, Department of Chemistry, Gainesville, Florida, U.S.A

[3] Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Food Science and Technology, Blacksburg, Virginia, U.S.A

Received: 13.01.2015

Accepted: 29.01.2015

Published online: 02.02.2015

Corresponding author:

Paul J. SARNOSKI, University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Food Science and Human Nutrition, Gainesville, Florida, 32611, U.S.A

E-mail: psarnoski@ufl.edu

Abstract:

Peanut skins are currently a waste product that may be a potential source of flavonoid rich compounds. In order to make use of these compounds, an extract would need to be produced. One of the potential issues with a peanut skin extract could be that any aflatoxins in the whole skins may be concentrated by solvent extraction. A multistep peanut skin extraction (PSE) method (100% water) and a methanol-water method (30:70 and 80:20) were used to extract proanthocyanidins from natural peanut skins samples and from peanut skin samples treated with an aflatoxin standard to determine the recovery by each extraction procedure. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) detection was employed for the determination and quantitation of aflatoxins G2, G1, B2, and B1 in the extracts from each of the samples. No aflatoxins of interest were detected in the PSE, 30% methanol aqueous (aq.), and 80% methanol aq. extract of un-spiked peanut skin samples. For aflatoxin spiked standard (G2, G1, B2, B1) samples, the PSE method (100% water) recovered the least aflatoxin with mean recoveries of 1-2%. The 30% methanol aq. procedure yielded mean recoveries of 17-36%. The 80% methanol aq. extraction method recovered the most aflatoxin, with mean recoveries of 35-63%. Statistical analysis revealed significant differences in aflatoxin recovery between the three extraction methods, indicating that both concentration and type of extraction solvent play significant roles in extraction of aflatoxin. This study provides evidence that if aflatoxins are present in the starting material for a flavonoid rich extract, the aflatoxins will carryover and concentrate in the resultant extract, especially if a high percentage of methanol is used as the major extraction solvent.

Keywords:

Phenolic compounds, peanut, aflatoxins, LC-MS

Introduction

The safety of the U.S. food supply is an important current issue. Millions of dollars are invested every year to ensure the safety of the U.S. food supply. Along with concerns about food pathogens, and allergens, mycotoxins including aflatoxins are also of high concern. Aflatoxins are naturally occurring mycotoxins that are frequently produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* species of fungi. Although there are a range of different types of aflatoxins, the major aflatoxins of concern in food are designated B1, B2, G1, G2 (Sweeney and Dobson, 1998). The names of aflatoxins relate to their fluorescent color (B=blue and G=green). The order of their human toxicity is B1>G1>B2>G2 with B1 being at least two times more toxic than G1 (Hussein and Brasel, 2001). Contamination often occurs in nuts, peanuts, spices, corn, cottonseed, and other oil seeds (Stroka et al., 2000). Therefore the possibility exists that aflatoxins could be present in any manufactured good that contains the aforementioned ingredients in the product. Aflatoxins are quite stable compounds structurally due to ample conjugation. As such, aflatoxins are likely to remain present in a food product even after the processing or degradation of a contaminated food product because their decomposition temperatures range from 237°C to 306°C (Rustom, 1997). In the United States the level of aflatoxins in peanuts must be 15 ng/g or less (CFR, 2014); in the European Union the level is even stricter, at 2-4 ng/g (Blesa et al., 2003). Aflatoxins cost the southeastern U.S. peanut industry approximately $ 25 million annually (Lamb and Sternitzke, 2001). Aflatoxin contamination is most likely to occur at or above 30°C, which promotes growth of the fungi that is known to produce the toxin (Scheidegger and Payne, 2005).

Aflatoxin detection can be difficult since the compounds need to be extracted from a complex food matrix. Aflatoxin concentration in a product is often not uniform. This requires that many samples be taken and tested for aflatoxin to ensure the safety of the lot. In one study the variation due to sampling in powdered ginger was found to be 87% (Whitaker et al., 2009). Aflatoxins are often extracted with chloroform, methanol, ethanol or their aqueous (aq.) mixtures when applicable (Do and Choi, 2007). Acetonitrile is another solvent that has been used to extract aflatoxins. Most often a 70% methanol-water mixture is used. Of concern, is that often similar or the same solvents are used to extract proanthocyanidins, therefore it is likely that these extracts could contain aflatoxins as well. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits are quite commonly used to detect aflatoxins because of their ease of use (Gilbert and Vargas, 2005). The use of Fourier Transform Infrared Resonance (FTIR) Spectroscopy to detect aflatoxins has been performed, but it has not gained widespread use (Mirghani et al., 2001). Spectroscopy such as FTIR would be highly useful since it is a non-destructive technique, and thus can be altered into an inline processing technique.

Due to the ability of aflatoxins to fluoresce, Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Chromatography (HPLC) with fluorescence detection is a common and inexpensive often-employed technique to detect aflatoxins. In addition, LC-MS has been used to detect aflatoxins in the positive mode since it gives increased ionization efficiency over negative mode (Blesa et al., 2003; Nonaka et al., 2009). LC-MS has been shown to be a specific and precise method for the determination and quantitation of both proanthocyanidins and aflatoxins. Common to both classes of compounds, a reversed phase column is often used (Ventura et al., 2004; Cavaliere et al., 2007; Bacaloni et al., 2008; Nonaka et al., 2009; Sarnoski et al., 2012). A gradient elution program is employed, with a choice of various effective solvents for the mobile phase. Cavaliere et al., (2007) used acetonitrile-water as mobile phase A and water as mobile phase B (both with added ammonium formate) to identify aflatoxins in maize extracts. The same solvents and concentrations were employed by Bacaloni et al., (2008) for the identification of aflatoxins in hazelnuts. A methanol-acetonitrile mobile phase A and aq. ammonium formate mobile phase B elution program were employed by Nonaka et al., (2009), also for the separation of aflatoxins. For the determination of proanthocyanidins in Virginia-Type peanut skins, Sarnoski et al., (2012) used an aq. ammonium acetate solution as solvent A and 100% methanol as solvent B. For its precision, selectivity, and reproducibility, LC-MS was the method of choice for the separation, identification, and quantitation of aflatoxins for this project.

Peanut skins are of particular interest to researchers as a potential source of a number of bioactive flavonoids, such as proanthocyanidins. Due to a growth in this field of research, the use of peanut skin extracts or components of peanut skin extracts as a beneficial additive in foods or in non-food materials is growing in likelihood and achievability. This presents a potential food safety issue, due to the possible concentration of harmful aflatoxins, primarily the most implicated aflatoxins of B1, B2, G1, and G2 in such extracts. Aflatoxins have been found to occur in peanut kernels and shells, but no researchers to date have analyzed the skins for aflatoxins. Therefore the objectives of this project were to determine if aflatoxins can exist in the skins of peanuts, and answer the question of whether the aflatoxins could be concentrated due to the extraction procedure used on the peanut skins. Emphasis was placed on the significance of the extraction solvent composition to the aflatoxin concentration of the final extract. The data obtained from the determinations made can assist in the search for a valuable and healthful use for peanut skins while maintaining food safety standards.

Materials and Methods

Extract source and standards

Peanut skins (Virginia variety) were obtained from a commercial source (Tidewater Blanching, Suffolk, Va., U.S.A.). Upon receipt the peanut skins were frozen and stored at -20 °C. Unless otherwise noted, all chemicals were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, Pa., U.S.A.). An aflatoxin mixed standard (1 µg/mL B1, 0.3 µg/mL B2, 1 µg/mL G1, 0.3 µg/mL G2) in methanol was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., U.S.A.). The analytical concentration for each lot was specified on the certificate of analysis and differed slightly from lot to lot (see exact concentrations at footnote of Table 1).

Single solvent extraction

Peanut skins were extracted by placing 1 g of skins in 10 mL of 30% methanol aq. or 80% methanol aq. for 15 min, using a Fisher Scientific Ultrasonic Model FS20 (Pittsburgh, Pa., U.S.A) bath to assist extraction. The liquid portion was then 0.2 µm syringe filtered using Whatman PTFE Puradisc™ syringe filters (Whatman Inc., Piscataway, N.J., U.S.A.) and the volume was measured. A clean round bottom flask was pre-weighed and the liquid portion was transferred into the flask. The solvent was then evaporated under vacuum using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor RII, Labortechnick AG, Switzerland) to dryness. The flask was then slowly oven dried at 50 °C, the weight was recorded when all solvent was lost, and constant weight was achieved. The yield was determined by the difference between the weights of the empty and extract containing flasks.

Table 1. Aflatoxin content in un-spiked and spiked samples (ng/g).

	Un-Spiked Samples (ng/g)			
Solvent	**Aflatoxins**			
	G2	**G1**	**B2**	**B1**
PSE (100% H_2O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Methanol 30%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Methanol 80%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Spiked Samples (ng/g)			
Solvent	**Aflatoxins**			
	G2	**G1**	**B2**	**B1**
PSE (100% H_2O)	7.05 ± 0.15	14.75 ± 0.95	3.70 ± 0.40	9.20 ± 0.70
Methanol 30%	107.7 ± 3.95	209.9 ± 1.50	51.95 ± 2.45	162.8 ± 5.50
Methanol 80%	185.2 ± 4.90	471.8 ± 2.10	99.20 ± 6.10	410.1 ± 7.90

n.d. signifies not detected

Analytical standard concentrations for the lot were (0.961 µg/mL B1, 0.280 µg/mL B2, 0.903 µg/mL G1, 0.296 µg/mL G2) in methanol.

Multistep peanut skin extraction (PSE) procedure

The method used for extraction of proanthocyanidins has been previously described (Masquelier, 1987). Briefly, peanut skins (100 g) were extracted with boiling deionized water (99.7 °C) at a ratio of 1 g to 10 mL. Filtration was performed to remove any remaining solid particles. Sodium chloride was added to the filtrate to the point of saturation (approximately 20% w/w). Filtration was repeated to remove precipitates. The phenolic compounds were then extracted in a separatory funnel using ethyl acetate and dried with sodium sulfate. The ethyl acetate extract was then concentrated via a rotary evaporator to about 1/5 the initial volume. Finally, the proanthocyanidins were precipitated with three equal volumes of chloroform and filtered. After air drying, the proanthocyanidin precipitate was a tan powder. Yields of approximately 1-1.5 g of powder were obtained from 100 g of peanut skins.

Determination of Aflatoxin Recovery

Aflatoxin recovery was determined by adding 1 mL of the aflatoxin mixed standard to 1 g of peanut skins in a glass tube for the PSE procedure, 30% methanol aq., and 80% methanol aq. extractions. The aflatoxin mixed standards (all from the same lot) were added to triplicate portions of dry peanut skins, and homogenized manually with a glass rod. The skins where then allowed to dry overnight at ambient temperature in a fume hood. Peanut skins were then extracted according to the 30% methanol aq., 80% methanol aq., or PSE procedure. One-way ANOVA was used to test for difference between treatment groups at the $\alpha = 0.05$ level.

MS Identification

The ESI-LC-MS system consisted of an Agilent (Palo Alto, Ca., U.S.A.) 1100 series HPLC coupled to a ThermoFinnigan (San Jose, Ca., U.S.A.) LCQ quadrapole ion trap mass spectrometer with electrospray ionization (ESI). LC separation of the extracts was accomplished with a Waters (Milford, Ma., U.S.A.) XTerra MS C18 (15 cm x 2.1 mm i.d., 3.5 µm,) column with guard column. A gradient method, consisting of solvent A (0.2% acetic acid in water) and solvent B (0.2% acetic acid in methanol), was applied at a flow rate of 0.15 mL/min as follows: 5-50% B from 0 to 15 min, 50-95% B from 15 to 45 min, and held at 95% B from 45 to 60 min, followed by column equilibration. MS data was acquired under positive mode, using Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma., U.S.A.) and analyzed with the same software. Comparison of product ion spectra in samples and standards was used quantitate aflatoxins. The optimized electrospray/ion optics parameters were as follows: spray voltage 3.3 kV; sheath gas (nitrogen), capillary voltage 12.5 V; capillary temperature 250°C; tube lens offset voltage 0 V.

Results and Discussion

Aflatoxin content was quantitated by (+) ESI-MS/MS integration of aflatoxin product ion peaks (Figure 1). In un-spiked peanut skin extracts the product ion abundances were below the acceptable range for detection/quantification or the presence of the aflatoxins was absent in these samples. For the spiked samples aflatoxin product ions were in range for quantification, and matched the expected fragmentation pattern for identification. Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 give characteristic $[M+H]^+$ fragment ions at m/z 313, 315, 329, and 331 respectively, and have differentiating MS/MS spectra (Blesa et al., 2003). To determine the recovery using the different extraction procedures, peanut skin samples were spiked at ratio of (1 mL/g of mixed standard). The PSE procedure which uses boiling water as the main solvent for extraction, exhibited the least amount of recovery of aflatoxin into the final extract (Table 1). Overall recoveries of the aflatoxins for the PSE method were around 1% (Table 2). The 30% methanol aq. procedure extracted more aflatoxins, and recoveries were around 25% using this extraction solvent. Finally, the 80% methanol aq. extract recovered the greatest amount of aflatoxins, with recoveries being in the 50% range. Overall, when the methanol content used for extraction increased, so did the efficiency of the recovery for aflatoxin. According to ANOVA results every aflatoxin (B1, B2, G1, G2) by extraction method was statistically different (Table 2). This study provides evidence that concentration of aflatoxin as a result of producing a phenolic extract is occurring. When the amount of aflatoxins in the extract was calculated for all treatments except for the water based extraction values were found to be concentrated over their spike levels in the skins.

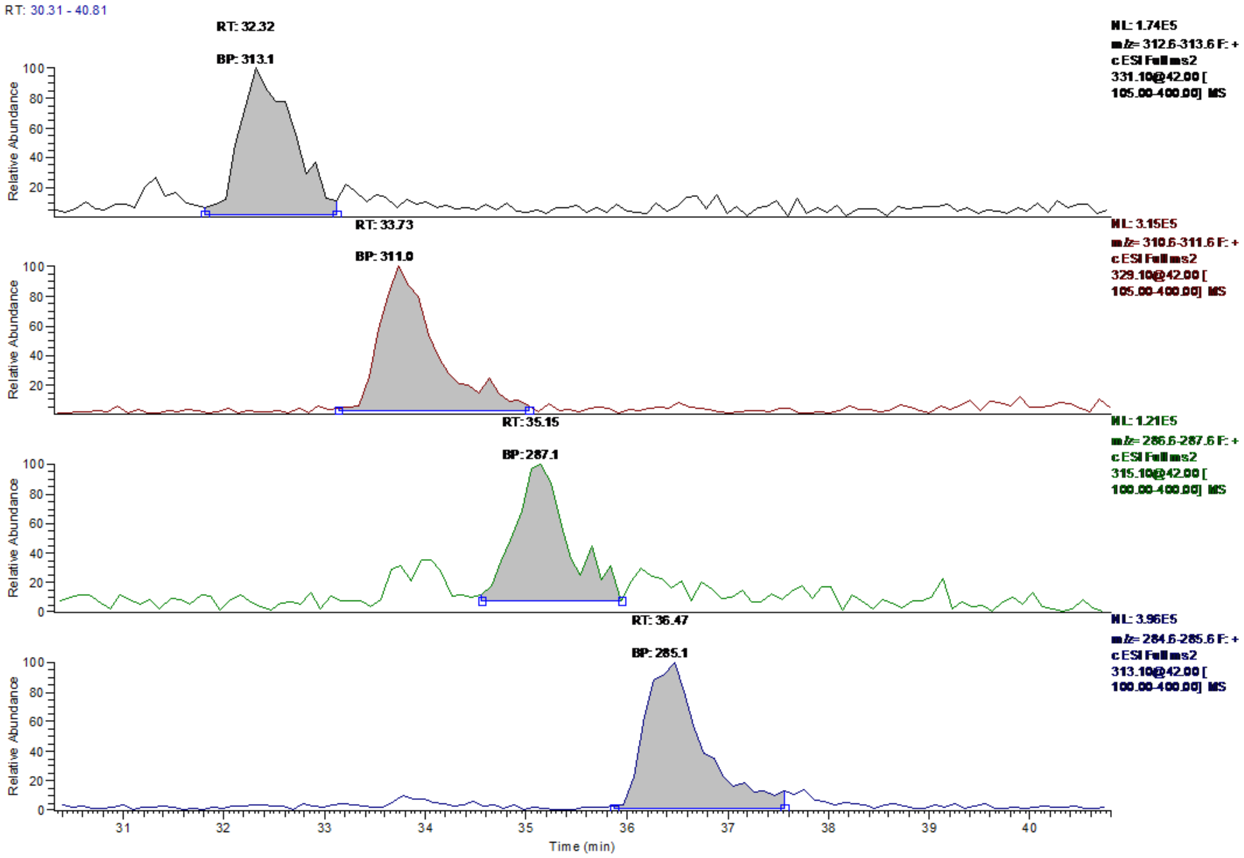


Figure 1. Typical chromatograms obtained from peanut skins samples spiked with aflatoxins. Quantitation was performed by integration of each aflatoxins major product ion.

Table 2. Average Aflatoxin Recoveries (%) ± standard error (SE).

Control Samples (%) – aflatoxins not detected				
	Spiked Samples (% Recovery)			
Solvent	**Aflatoxins**			
	G2	**G1**	**B2**	**B1**
PSE (100% H_2O)	2.38^a ±0.05	1.63^a ±0.10	1.33^a ±0.15	0.96^a ±0.05
Methanol 30%	36.36^b ±1.35	23.24^b ±2.35	18.55^b ±0.85	16.94^b ±1.60
Methanol 80%	62.56^c ±8.40	52.25^c ±4.65	35.42^c ±2.15	42.68^c ±0.80

Mean values with the same letter in a column indicate no significant difference.

Extract Production

Methanol is an extraction solvent often used to extract phenolic compounds. When aq. methanol, ethanol, and acetone extracts of peanut skins were compared, the methanolic extracts were found to have the highest phenolic contents (Nepote et al., 2000). Consequently, 80% (v/v) methanol aq. extracts have been used to extract aflatoxins (Shannon and Shotwell, 1979) and more recently by Nonaka et al., (2009). Decreasing the amount of organic solvent for extraction generally results in lower aflatoxin extraction efficiencies (Bradburn et al., 1990). Although methanol extraction is quite efficient at extracting phenolic compounds, there may be some unintended food safety consequences of using methanol to extract phenolics, namely that aflatoxins will be extracted and concentrated during the process. This experiment generally illustrates that if a higher concentration of organic solvent is used, then there would likely be a greater concentration of aflatoxin in the resultant extract. Therefore a lower concentration of organic solvent would not be recommended for extracting phenolic compounds, but it should limit the extraction of mycotoxins in peanut skins.

Recovery and Extraction Efficiency

The performance of each of the extraction methods can be evaluated based upon their aflatoxin recovery capabilities. No aflatoxins could be detected in un-spiked samples because the aflatoxins were absent from the samples, or the aflatoxins were present at a level below the detection threshold. The lack of aflatoxins in the un-spiked samples was most likely due to the lack of the presence of *Aspergillus* species fungi on the skins, which are the microorganisms commonly implicated as the cause of aflatoxin presence (Passone et al., 2007). The boiling water (PSE) extraction performed on the spiked samples had the lowest recovery (Table 2). When using a methanol concentration of 80% and employing the same ultrasonic procedure used in the 30% methanol aq. procedure aflatoxin recoveries averaged around 50% (Table 2). Aflatoxin G2 consistently showed the highest recovery irrespective of extraction method. Interestingly, the methanol aq. extractions were particularly efficient for the extraction of B1 and G1 (Table 2), which has been identified as more carcinogenic and toxic than aflatoxins B2 and G2 (Van Egmond et al., 1995; Jaimez et al., 2000).

Overall, the resulting aflatoxin recoveries for this project were lower than expected based upon comparison with other studies. Nonaka et al., (2009) reported recoveries ranging from 83%-109%, and Bacaloni et al., (2008) reported recoveries ranging from 60% -94%. However these studies examined aflatoxins in the peanut kernel and other food samples, and the extraction process was different than described in this study. The recoveries in this study make evident the effects of solvent type (and composition) on the four aflatoxins as a group and between specific aflatoxins (i.e. B1 vs B2). Sample type also seems to play a significant role in recovery efficiency, due to the effects of matrix differences. In a comparative study by McDaniel et al., (2011) aflatoxin recoveries were found to be dependent not only upon the type of cleanup method applied, but also upon the sample type. As reported by McDaniel et al., (2011) samples of both corn and dried distillers grains (DDG) were spiked and subjected to the same extraction and clean up (SPE) method. In the case of afltatoxins B1 and B2, a significant recovery difference was found in extraction recoveries (104.5% ±7.78 from corn vs. 74% ±10.07 from DDG for B1 and 67% ±9.9 from corn vs. 40% ±5.86 from DDG for B2) was found in the McDaniel et al., (2011) study. Significant differences were also found in HPLC column elution capabilities (120% ±21.78 from corn vs. 75% ±23.97 from DDG for B1 and 74% ±9.07 from corn vs. 40% ±5.86 from DDG for B2), through the analysis of spiked extracts of these grains (McDaniel et al., 2011). The differences in recoveries were attributed to a varying ability for some aflatoxins to bind to and to be released from both SPE columns and HPLC columns (McDaniel et al., 2011).

Various sample preparation procedures have been used for extraction of aflatoxins, and the specific procedure used usually depends upon the type of food sample used. Differing sample preparation procedures also seem to affect measurable recoveries. Recovery yields would have likely differed if the samples had been finely ground before extraction. Instead, the peanut skin samples used for this project were used in their natural form. It has been shown for hazelnuts that an increase in ultrasonication time (up to 30 minutes) is required for obtaining absolute recoveries when samples are higher in proteins or carbohydrates (Bacaloni et al., 2008). Given that peanut skins can average 49.2% carbohydrates (Hoffpauir, 1953) and hazelnuts average 6% carbohydrates (Bacaloni et al., 2008), peanut skin recoveries using the methanol method may have been greater if ultrasonication times had been extended to 30 minutes or more. However, in order to keep the procedure fairly rapid a 15 minute sonication time was chosen for this study.

The PSE procedure using boiling water as an extraction solvent did not employ an ultrasonication step. As such, the minimal aflatoxin recovery could potentially be attributed to solvent type, due to the lack of ultrasonication, or to a combination of the two variables. While methanol has an average polarity index of approximately 5.1, water has an average polarity index of 9. Aflatoxins solubility is reported to be 3.150 g/L in water (DHHS, 2011). Solubility of aflatoxins has been reported to be better in organic solvents like methanol, acetone, and chloroform (Garcia et al., 1994). As such, one would expect that water (PSE procedure) would be less likely to extract aflatoxins than the methanol solutions. However, the dielectric constant of water decreases from approximately 88 to 56 going from 0°C to 100°C (Malmbert and Maryott, 1956), and the average dielectric constant of methanol is approximately 32.7 (University of Washington, 2014). As such, the polarity of boiling water should be more closely comparable to the polarities of the two aq. methanol solvents, therefore poor recovery of aflatoxins cannot be attributed to the use of boiling water alone, but may also relate to the multiple steps of the purification procedure. In a separate study proanthocyanidin contents were found to be higher using the PSE method, as opposed to water-methanol, or water-acetone extracts of peanut skins (Sarnoski et al., 2012). Thus the PSE procedure provides the dual advantage of efficiently extracting proanthocyanidins, and posing the least amount of risk of extracting aflatoxins.

In order to explain the low aflatoxin recoveries using the boiling water method as opposed to the methanol aq. methods, the effects of using different extraction procedures must be considered. The water extraction employed a multi-step procedure with a final precipitation step, in which chloroform is added to the extract. Aflatoxins are notably soluble in chloroform (DHHS, 2011). As such, this final precipitation step may provide a secondary manner in which remaining aflatoxins in the extract can be separated from the resulting precipitate. Also important to note, the water extraction did not employ an ultrasonication step, which has been shown to increase efficiency of aflatoxin extraction from foods such as hazelnuts, peanuts, cashews, and pistachios (Bacaloni et al., 2008) and may lower the recovery further in this instance.

Conclusions

A statistically significant difference in recovery efficiencies were found among each of the extraction procedures used in this project. In order to minimize the recovery of aflatoxins while extracting plant flavonoids, it is necessary to consider a number of factors. In the interest of public health and safety, a delicate balance must be maintained between solvent flavonoid extraction potential and solvent aflatoxin recovery efficiency. This project provides evidence that solvents with potentially similar aflatoxin recovery capacities may result in very different recovery efficiencies due to procedural differences. This research demonstrates that a 100% boiling water, multi-step extraction method for proanthocyanidins exhibits a lower recovery rate for aflatoxins compared with methanol aq. extractions and is therefore potentially the safest method explored within the scope of this project for extracting flavonoids from peanut skins.

References

Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., Laganà, A. (2008): Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179: 182-189.

Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C., Marin, R., Manes, J. (2003): Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1011(1-2): 49-54.

Bradburn, N., Coker, R.D., Jewers, K., Tomlins, K.I. (1990): Evaluation of the ability of different concentrations of aqueous acetone, aqueous methanol and aqueous acetone: Methanol (1:1) to extract aflatoxin from naturally contaminated maize. *Chromatographia*, 29(9-10): 435-440.

Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Nzzari, M., Samperi, R., Laganà, A. (2007): A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21: 550-556.

Code of Federal Regulations (CFR). (2014): Minimum quality and handling standards for domestic and imported peanuts marketed in the United States. Code title 7, § 996.11

Department of Health and Human Services (DHHS). (2011): National Toxicology Program Report on Carcinogens, Twelfth Edition. Available from http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Aflatoxins.pdf. Accessed 2014 April 14.

Do, J.H., Choi, D.K. (2007): Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 12(6): 585-593.

Hoffpauir, C.L. (1953): Peanut composition, relation to processing and utilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(10): 668-671.

Hussein, H.S., Brasel, J.M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2): 101-134.

Garcia, M., Blanco, J., Suarez, G. (1994): Aflatoxins B1 and G1 solubility in standard solutions and stability during cold storage. *Mycotoxin Ressearch,* 10(2): 97-100.

Gilbert, J., Vargas, E. (2005): Advances in sampling and analysis for aflatoxins in food and animal feed. In: Abbas H, editor. Aflatoxins and Food Safety. Boca Raton: CRC Press. pp. 237-268.

Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P. (2000): Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A,* 882(1): 1-10.

Lamb, M.C., Sternitzke, D.A. (2001): Cost of aflatoxin to the farmer, buying point, and sheller segments of the southeast United States peanut industry. *Peanut Science,* 28: 59-63.

Malmberg, C.G., Maryott, A.A. (1956): Dielectric constant of water from 0° to 100°C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards,* 56(1): 1-8.

Masquelier, J. (1987): Inventor; Societe Civile d'Investigations Phamacologiques d'Aquitaine, Horphag Overseas Ltd., assignees. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. U.S. patent 4, 698, 360.

McDaniel, A., Holmes, W.E., Williams, P., Armbrust, K.L., Sparks, D.L., Brown, A.E. (2011): Effect of matrix clean-up for aflatoxin analysis in corn and dried distillers grains. *Scientific Research Essays* 2(4): 1-8.

Mirghani, M.E.S., Man, Y.B.C., Jinap, S., Baharin, B.S., Bakar, J. (2001): A new method for determining aflatoxins in groundnut and groundnut cake using Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78(10): 985-992.

Nepote, V., Grosso, N.R., Guzman, C.A. (2000): Antioxidant activity of methanolic extracts from peanut skin. *Molecules,* 5(3): 391-395.

Nonaka, Y., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., Kataoka, H. (2009): Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* 1216(20): 4416-4422.

Passone, M.A., Resnik, S., Etcheverry, M.G. (2007): Potential use of phenolic antioxidants on peanut to control growth and aflatoxin B1 accumulation by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 87(11): 2121-2130.

Rustom, I.Y.S. (1997): Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry,* 59(1): 57-67.

Sarnoski, P.J., Johnson, J.V., Reed, K.A., Tanko, J.M., O'Keefe, S.F. (2012): Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC–MSn. *Food Chemistry*, 131(3): 927-939.

Scheidegger, K., Payne, G.A. (2005): Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. In: Abbas H, editor. Aflatoxins and Food Safety. Boca Raton: CRC Press. p. 137-166.

Shannon, G.M., Shotwell, O.L. (1979): Minicolumn detection methods for aflatoxin in yellow corn: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(5): 1070-1075.

Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U., Gilbert, J. (2000): Using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: Collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 83(2): 320-340.

Sweeny, M.J., Dobson, A.D.W. (1998): Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3): 141-158.

University of Washington. (2014). Dielectric Constant of Common Solvents. Available from http://depts.washington.edu/eooptic/linkfiles/dielectric_chart%5B1%5D.pdf. Accessed 2014 April 21.

Van Egmond, H.P., Visconti, A., Boenke, A., Speijers, G.J.A. (1995): Mycotoxins and toxic plant components (EC, WHO/IPCS, FAO, and ILSI Europe joint workshop). *Natural Toxins*, 3(4): 181.

Ventura, M., Gomez, A., Diaz, J., Broto, F., Agut, M., Comellas, L. (2004): Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1048(1): 25-29.

Whitaker, T.B., Trucksess, M.W., Weaver, C.M., Slate, A. (2009): Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5): 1291-1299.

1(2): 84-93 (2015) doi: 10.3153/JFHS15008

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

ORIGINAL ARTICLE/ORİJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER TAM MAKALE

FARKLI TAŞIYICILARLA RASYONA EKLENEN DEMİR DİKENİNİN (*Tribulus terrestris*) YUMURTACI TAVUKLARDA VERİM VE YUMURTA KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Metin DURU[1], Ahmet ŞAHİN[2]

[1] Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Zootekni Bölümü, Uşak

[2] Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kırşehir

Received: 19.01.2015

Accepted: 02.02.2015

Published online: 02.02.2015

Corresponding author:

Metin DURU, Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Zootekni Bölümü, 1 Eylül Yerleşkesi, Uşak, Türkiye

E-mail: durumet@gmail.com; metin.duru@usak.edu.tr

Öz:

Bu çalışma, zengin bir saponin kaynağı olan demir dikeni (*Tribulus terrestris*) (TT) bitki tozunun bentonit, selüloz ve pamuk yağı ile karıştırılarak yumurta tavuk yemine eklenmesinin beyaz yumurtacı tavuklarda performans özellikleri, yumurta kalite kriterleri, kemik kalsiyum kül düzeyleri, yumurta sarısı kolesterol düzeyi ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerini belirlemek amacı ile yürütülmüştür. Toplam 192 yumurtacı tavuk her bir grupta 16 hayvan olacak şekilde 12 gruba dağıtılmıştır. Deneme 0 (kontrol); 1 g TT; 2 g TT; 0.1 g pamuk yağı; 0.5 g selüloz; 0.5 g bentonit; 1 g TT ile 0.1 g pamuk yağı; 2 g TT ile 0.2 g pamuk yağı; 1 g TT ile 0.5 g selüloz; 2 g TT ile 1 g selüloz; 1 g TT ile 0.5 g bentonit ve 2 g TT ile 1 g bentonit gruplarından oluşmaktadır. Kontrol grubuna göre 2 g demir dikeni, bentonit ile karışan 2 g demir dikeni, yağ ile karışan 1 g ve 2 g demir dikeni gruplarında plazma kalsiyum değerleri önemli derecede yükselmiştir ($P<0.001$). Sarı indeksi ve haugh birimi bakımından bentonit ile karıştırılan 1 g demir dikeni kontrol grubuna göre sayısal olarak daha yüksek değer vermiştir ($P>0.05$). Kontrol grubuna göre bentonit ile karışan 2 g demir dikeni ve selüloz ile karışan 2 g demir dikeni grupları sayısal olarak daha düşük yumurta sarısı kolesterol düzeyi değerleri vermişlerdir ($P>0.05$).

Anahtar Kelimeler:

Tribulus terrestris, Yumurta kalitesi, Kolesterol, Yumurtacı tavuk.

Abstract:

Effects of Dietary *Tribulus terrestris* With Different Carriers on Performance and Egg Quality of Laying Hens

This study has been carried out to determine the effect of powder of Tribulus terrestris (TT) which is a rich saponin source, added in diets of laying hen with in cotton oil, cellulose and bentonite, on the cholesterol level of egg yolk, blood parameters, the level of ash calcium, egg quality and the performance characteristics of white laying hens. In total 192 hens were used by allocating them into 12 groups each included 16 animals. Treatment groups were control (0); 1 g TT; 2 g TT; 0.1 g cotton oil; 0.5 g cellulose; 0.5 g bentonite; 1 g TT with 0.1 g cotton oil; 2 g TT with 0.2 g cotton oil; 1 g TT with 0.5 g cellulose; 2 g TT with 1 g cellulose; 1 g TT with 0.5 g bentonite and 2 g TT with 1 g bentonite. The blood calcium levels increased at the groups of 2 g of TT, 2 g of TT powder with in bentonite, 1 g and 2 g of TT powder with in oil compared to the control group ($P<0.001$). Yolk index and haugh units levels to numerically increased at the group of 1 g of TT powder with in bentonite compared to the control group ($P>0.05$). Egg yolk cholesterol levels to numerically decreased at the groups of 2 g of TT powder with in bentonite and 2 g of TT powder with in cellulose compared to the control group ($P>0.05$).

Keywords:

Tribulus terrestris, Egg quality, Cholesterol, Laying hens

Giriş

Yem katkı maddesi olarak uzun zaman, yemden yararlanmayı arttırıcı ve gelişmeyi hızlandırıcı etkisi nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılan anabolizanlar ve antibiyotikler hayvansal ürünlerde özelliklede kanatlıda kalıntı bırakarak insan sağlığına zararlı olabilecekleri düşüncesi ile ülkemiz ve Avrupa Birliği ülkelerinde yasaklanmıştır. Avrupa Birliği ülkelerinde ve Ülkemizde antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanılmasının yasaklanmasından sonra antibiyotiklerin yerine alternatif olarak bitkisel ekstrakt ve tıbbi ve aromatik bitkileri kullanılabileceği gündeme gelmiştir (Kamel, 2001; Tipu ve ark., 2006). Aynı zamanda antibiyotiklere alternatif olma açısından son derece etkin olan bu grubun daha etkili olarak kullanıma sokulması ile hem daha ekonomik hem de tüketici sağlığı açısından sorunsuz hayvansal ürünlerin eldesi mümkündür (Kutlu, 2001). Akdeniz iklim kuşağında yer alan, tıbbi ve aromatik bitkilerce eşsiz zenginliğe sahip ülkemizde bu araştırmaların istenen düzeye ulaşamaması, kaynaklarımızın değerlendirilememesi adına büyük bir eksiklik olarak ortaya çıkmaktadır (Kutlu, 2007). Günümüzde, insanlara sağlıklı hayvansal ürün üretiminde kullanılan veya kullanılma potansiyeli bulunan bitkileri ve bitkisel ekstraktları daha iyi tanımlamak, gıda kaynaklarının üretiminde güvenilir miktarlarını ve karışımlarını belirlemek için çalışmalar hızla devam etmektedir.

Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitkisi saponinlerce zengin olduğu, saponinlerin canlılarda performans ve sindirim ile bunun devamı olan emilim üzerine olumlu yönde etkili olduğu ve antioksidan etkisine sahip olduğu bilinmektedir (Anonim 2011; Grigorova ve ark., 2009; Jenkins ve Atwal, 1994). Kahverengi Lohman yumurtacılarında içme sularına eklenen Demir dikeni bitki ekstraktının serum glukoz seviyesini düşürdüğü (Grigorova ve ark., 2008b), yine aynı ekstraktın karma yeme katılması ile beç tavuklarında serum ve yumurta sarısı kolesterol seviyesini düşürdüğü, yumurta sarısı linoleik asit miktarını ise arttırdığı (Grigorova ve ark., 2009) ve W. Plymouth Rock-mini erkeklere içme suyu ile verilen ekstraktın serum kolesterol miktarını düşürdüğünü bildirmişlerdir (Grigorova ve ark., 2008a). Demir dikeni bitki tozunun etlik civcivlerde canlı ağırlık kazancını arttıran antibiyotikler kadar etkili olduğu, tüketicilere antibiyotiksiz piliç eti üretiminde demir dikeninin üretimde kullanılabileceği bildirilmiştir (Şahin, 2009). Demir dikeni bitkisinin yumurta tavuklarında verim performansı yönünde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Alternatif yem katkısı potansiyeline sahip olan Demir dikeni bitkisinin herhangi bir materyalle karıştırılarak hayvan beslemede kullanıldığına dair herhangi bir çalışma bulunamamış ve yumurtacı tavukların verim performansına ve kemik kalsiyum birikimine yönelik yapılmış herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bitki absorban özelliğinden dolayı Bentonit (Pahsa ve ark., 2007) ile, bağlayıcı özelliğinden dolayı Karboksimetilselüloz (Heitner ve Min, 1987) ile, ve mide de az yıkıma uğraması özelliğinden dolayı pamuk yağı (Toker ve ark., 1998) ile karıştırılarak demir dikeni tozunun hayvanlara yedirilmesi bebeklikten itibaren insan beslenmesi açısından hayvansal protein teminde önemli bir yer tutan yumurta verim performansını ve kalitesini etkileyebilir. Bu çalışmada, yumurtacı tavukların beslenmesinde Demir Dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun pamuk yağı, bentonit ve selüloz ile kullanılması sonucunda yumurta verim performansları, yumurta kalitesi, yumurta sarısı kolesterol değerlerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmanın hayvan materyalini 43 haftalık yaşta toplam 192 adet Super Nick beyaz yumurtacılar oluşturmuştur. Denemenin yem materyalini 1. dönem standart yumurtacı yemi (2750 kcal ME kg^{-1}, %15 HP) oluşturmuştur (Tablo 1).

Deneme grupları, benzer canlı ağırlık ve benzer yumurta veriminde olacak şekilde tesadüfü olarak bireysel kafeslere dağıtılan, her bir muamele grubunda 16 hayvanın bulunduğu 12 muamele grubundan oluşmuştur (Tablo 2).

Rasyonlara eklenen Demir dikeni bitkisi Hatay ili Serinyol ilçesi Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Sökmen Kampüs arazisinden toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri laboratuarda temiz ve kuru bir zeminde kurutulmuş, laboratuar tipi değirmende 1 mm elekten geçirilerek yem katkısı olacak şekilde toz haline getirilmiştir. Elde edilen katkının içerdiği yağ asidi bileşenleri (Özgüven ve Engin 2000) GC-MS 6890-HP 5972 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) (menşei: A.B.D.) cihazında HP 5 MS kolonunda (kolon özellikleri: uzunluk: 30 m, kalınlık: 0.25 mm, film kalınlığı: 0.25 µm, çalışma şartları: -60 - 350ºC, menşei: A.B.D., seri no: 19091S-433) tespit edilmiştir

(Tablo 3). GC-MS cihazı koşulları; ilk faz olarak cihaz 40°C'de 5 dakika tutularak 5°C'lik artışlarla 150°C'ye getirilmiştir. 2. faz olarak 150°C'de 10 dakika bekledikten sonra 5 °C'lik artışlarla 3. faza 220°C'ye getirilerek 15 dakika bekletilerek okumalar yapılmıştır.

Tablo 1. Denemede kullanılan 1. dönem yumurta yemi.

Table 1. Experimental layer diet (Phase I).

Ham maddeler (%)	
Beyaz Mısır	52.40
Tam Yağlı Soya	0.60
Soya Fasülyesi Küspesi	13.00
Kavrulmuş Soya	11.10
Mısır Gluten Unu	2.50
Buğday Kepeği	8.50
Tavuk Unu	3.00
DCP	1.20
Mermer Tozu	6.70
Tuz	0.30
Vitamin Karışımı*	0.33
Mineral Karışımı**	0.37
Analizle Bulunan Besin Madde İçeriği (%)	
Kuru Madde	91.18
Ham Protein	18.15
Ham Yağ	4.47
Ham Selüloz	3.15
Ham Kül	12.91

* *Her 1 kg'lık vitamin karışımı en az 7000 IU Vitamin A, 2000 IU Vitamin D_3, 15 mg Vitamin E, 2 mg Vitamin K_3, 5 mg Vitamin B_2, 10 mg Vitamin B_{12} içermektedir.*

** *Her 1 kg'lık mineral karışımı en az 60 mg Manganez, 50 mg Çinko, 25 mg Demir, 15 mg Bakır, 0.25 mg Kobalt, 1 g İyot, 0.2 mg Selenyum içermektedir.*

Tablo 2. Deneme modeli.

Table 2. Experimental design.

Gruplar	**Muamele**
1. Grup	Kontrol
2. Grup	1 g Demir Dikeni
3. Grup	2 g Demir Dikeni
4. Grup	0.1 g Pamuk Yağı
5. Grup	1 g Demir Dikeni ile 0.1 g Pamuk Yağı
6. Grup	2 g Demir Dikeni ile 0.2 g Pamuk Yağı
7. Grup	0.5 g Selüloz
8. Grup	1 g Demir Dikeni ile 0.5 g Selüloz
9. Grup	2 g Demir Dikeni ile 1 g Selüloz
10. Grup	0.5 g Bentonit
11. Grup	1 g Demir Dikeni ile 0.5 g Bentonit
12. Grup	2 g Demir Dikeni ile 1 g Bentonit

Tablo 3. Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun bazı yağ asidi bileşenleri.

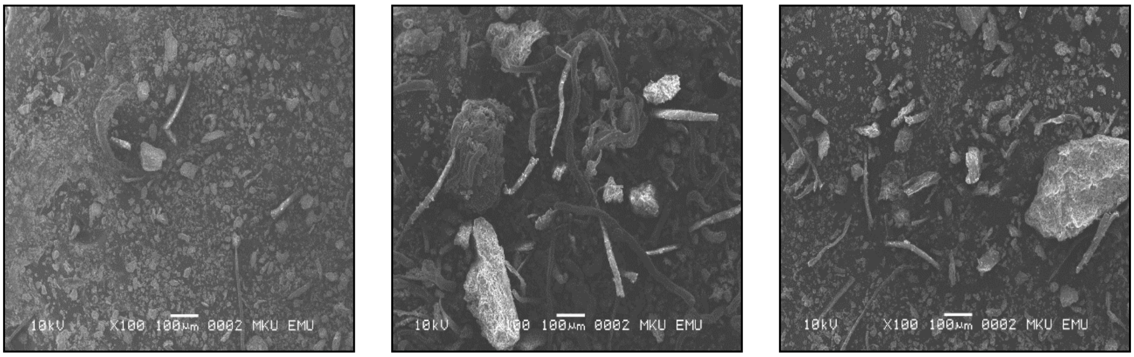
Table 3. Some fatty acid compounds of Tribulus terestris powder.

	RT	% Area	Bileşen
1	11.43	35.99	C 16:0 Palmitik asit
2	13.28	3.96	C 18:0 Stearik asit
3	13.43	5.90	C 18:1 Omega 9 (Cis-9) Oleik asit
4	13.81	6.27	C 18:2 Omega 6 (Cis-8,11,14) Linoleik asit
5	14.35	47.88	C 18:3 Omega 3 (Cis-11,14,17) Linolenik asit

Toz hale getirilen demir dikeni bitkisi toz halinde olan bentonit ve selüloz, sıvı halde bulunan yağ ile karıştırılmıştır. Yapılan ön çalışma sonunda yeme eklenen bitki tozunun % 50' si kadar bentonit, % 50'si kadar selüloz ve % 10'u kadar yağ olarak belirlenmiştir. Bu miktarlar belirlenirken kullanılan materyallerin bitki materyalini iyice örtmesi ve tek renk eldesine dikkat edilmiştir. İşlemler, tartılan bitki ve materyal falkon tüplere alındıktan sonra 3000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edilmiş, daha sonra ise 10 dakika vortekste karıştırılarak gerçekleştirilmiş ve elektronmikroskopta (JEOL-JSM-5500LV-Japon) görüntülenmiştir (Şekil 1).

Hayvanlar 35×45×40 cm boyutlarında önünde yemlikler, yumurta yolu ise yemliklerin hemen altında olan kafeslerde 8 hafta boyunca denemeye tabi tutulmuşlardır. Deneme boyunca hayvanlar 8 saat karanlık, 16 saat aydınlatmaya tabi tutulmuşlardır. Hayvanlara günlük 115 g olacak şekilde yem, su ise otomatik nipel suluklar ile serbest olarak sağlanmıştır. Deneme başında (DBCA) ve sonunda canlı ağırlık (DSCA) tartımı, günlük yem tüketimleri (YT), yumurta verimi (adet) (YV) ve yumurta kütlesi (g) (YK) tespiti, iki haftada bir herbir gruptan alınan 10'ar adet yumurtanın iç ve dış kalite özelliklerinin belirlenmesi; deneme başı, ortası ve sonunda her grupta 8'er adet olmak üzere toplamda 24 adet yumurtanın sarı kolesterol içeriğinin tespiti (Anonymous 1989); denemenin başında tesadüfen belirlenen 8 hayvandan deneme başı, ortası ve sonunda kan serumunda total protein, kolesterol, glukoz, trigliserit ve kalsiyum analizleri yapılmıştır. Deneme sonu itibari ile her gruptan 8 olmak üzere toplam 96 adet hayvan kesilerek sağ femur kemiklerinin ortası (medullar tabakanın yoğun olduğu kısım) çıkarılmış ve bu kemikte kalsiyum (Ca) ve kül değerleri belirlenmiştir (Jones ve Case 1990). Hayvanların kanatlarından heparinli tüplere alınan kan santrifüj edilerek serumlarından ayrılmış ve analizler yapılana kadar serumlar -20 C'de muhafaza edilmiştir. Gerek kan serum analizlerinde gerekse yumurta sarısı kolesterol içeriğinin tespiti hazır kitler (Diasis Diagnostic Systems) yardımıyla spektrofotometrede (Shimadzu, UVmini-1240) belirlenmiştir.

Bu çalışmanın deneysel kısmı çalışmaları için 14.05.2009 tarih ve 2009-4-12/40 dosya numarası ile Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı kurumundan "Etik Kurul" izni alınmıştır.



(a) Bentonit içinde Demir dikeni tozu görüntüsü

(b) Selüloz içinde Demir dikeni tozu görüntüsü

(c) Pamuk Yağı içinde Demir dikeni tozu görüntüsü

Şekil 1. Elektronmikroskopta Bentonit, Selüloz ve Yağ içinde Demir dikeni bitki tozunun görüntüsü.

Figure 1. The images of tribulus terestris plant powder with bentonite, cellulose and oil on electron microscope.

Araştırmada elde edilen veriler SAS (1996) paket programı kullanılarak General Linear Model (PROC GLM) prosedürü ile varyans analizine tabi tutulmuş ve muamele grup ortalamalarının karşılaştırılmasında DUNCAN çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1987).

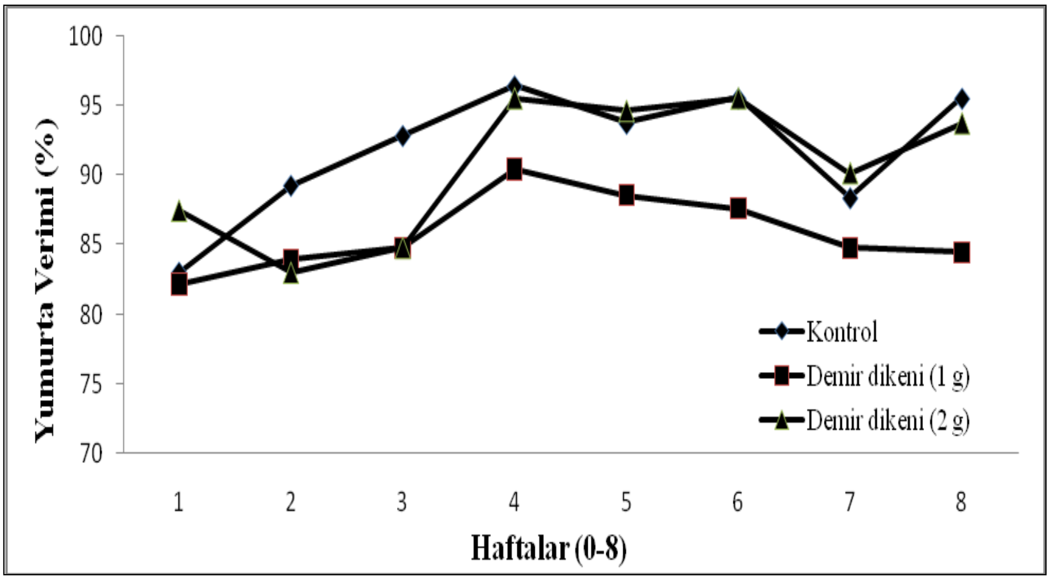
Bulgular ve Tartışma

Demir dikeni bitki tozu gruplarında verim performansı bakımından kontrol (negatif) grubuna göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$) (Tablo 4). Yumurta kalite kriteri olan şekil indeksi bakımından bentonit ile karıştırılan düşük doz demir dikeni grubu kontrol grubuna göre daha düşük, kuru kabuk ağırlığı bakımından yağ ile karıştırılan düşük doz demir dikeni grubu daha yüksek ve selüloz ile karıştırılan yüksek doz demir dikeni grubu ise daha düşük sarı ağırlığı değerleri vermişlerdir ($P<0.05$) (Tablo 5).

Kemik kalsiyum düzeyleri ise, % 4.62 ile 5.42 arasında değişmekle birlikte gruplar arasında istatistik olarak herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır ($P>0.05$). Deneme başı, ortası ve sonunda tespit edilen yumurta sarısı kolesterol düzeyleri ise normal değerleri vermiş ve gruplar arasında istatistiki olarak herhangi bir fark görülmemiştir ($P>0.05$) (Tablo 6). Deneme başı, ortası ve sonunda alınan plazmada glukoz (253-261 mg dL^{-1}), total protein (2.52-3.26 g dL^{-1}) ve trigliserid (483.01-1225.93 mg dL^{-1}) bakımından herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır ($P>0.05$). Plazma kalsiyum değerlerinde ise deneme başı ve deneme ortasında herhangi bir farklılığa rastlanmamış fakat deneme sonu itibari ile kontrol (negatif) (12.15 mg dL^{-1}) grubuna göre yüksek doz demir dikeni (18.42 mg dL^{-1}), bentonit ile karıştırılan yüksek doz demir dikeni (18.57 mg dL^{-1}), yağ ile karıştırılan düşük (17.48 mg dL^{-1}) ve yüksek (18.66 mg dL^{-1}) doz demir dikeni grupları daha yüksek plazma kalsiyum değerleri vermişlerdir ($P<0.001$). Plazma kolesterol değeri bakımından ise, yine deneme başı ve ortasında fark görülmemiş ($P>0.05$). Deneme sonu itibari ile selüloz kontrol (83.04 mg dL^{-1}), selüloz ile kaplı düşük (83.57 mg dL^{-1}) ve yüksek (84.64 mg dL^{-1}) doz demir dikeni grupları kontrol (115.37 mg dL^{-1}) grubuna göre düşük değerler vermişlerdir ($P<0.05$).

Yapılan literatür araştırmasında demir dikeni tozunun yalın, bentonit, selüloz ve yağ ile karıştırılarak yumurtacı tavuklara verilmesi ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmamıştır.

Bazı gruplarda kontrol (negatif) grubuna göre kan kalsiyum parametrelerinde farklılık olmasına rağmen ($P<0.05$), bu kemik kalsiyum değerine yansımamıştır. Kemik kalsiyum değerlerinin farklı olmaması, medullar kemikte yeterince kalsiyum deposunun olduğu şeklinde açıklanabilir. Zaten bu da yumurta kabuk kalınlığının yeterli oluşu ile de desteklenmektedir. Ayrıca hayvanlar 43 haftalık yaşta yani genç olduğundan kemik kalsiyum rezervleri muameleden etkilenecek kadar hassas değildir.



Şekil 2. Rasyona eklenen Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun yumurta tavuklarında yumurta verimine etkisi.

Figure 2. The effect of plant powder of Tribulus terestris on the cumulative egg yield of layer hens.

12 hafta boyunca 10 mg kg^{-1} demir dikeni ticari kapsül ekstraktı ile beslenen beç tavuklarının yumurta sarısındaki kolesterol seviyesinin önemli derecede düştüğü bildirilmiştir (P<0.05) (Grigorova ve ark., 2009). Mevcut çalışmada ise yalın olarak verilen demir dikenin yumurta kolesterol düzeyini etkilemediği gözlemlenmiştir (P>0.05).

Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların çıkması, demir dikeni bitkilerinin toplandığı arazilerdeki toprak kimyasının farklılığından ve farklı yaş ve/veya mevsimlerde toplanmış olabileceğinden kaynaklanabilir. Bu çalışmada demir dikeni bitkisi Temmuz-Ağustos döneminde üniversite kampüsünden toplanmıştır (Serinyol/Hatay). Amik ovasına yakın kampüs arazisine yaz-kış yeterli yağış almaktadır. Bu da bitki kompozisyonunun (kimyasının) seyreltik olabileceği dolayısıyla etken maddelerin daha az derişik olabileceğinden dolayı etki bulunamadığı söylenebilir.

Kontrol (negatif) grubuna göre yüksek doz demir dikeni, bentonit ile karıştırılan yüksek doz ve yağ ile karıştırılan yüksek ve düşük doz demir dikeni gruplarında kan kalsiyum değerlerinin yükseldiği görülmekte ve bu fark dozdan kaynaklanmaktadır (P<0.001). Saponinlerin bazı hormonal sistemleri harekete geçirerek kan kalsiyum düzeyini arttırdığı bilinmektedir (Avcı ve ark., 2007). Saponin kaynağı olan demir dikeni bu mekanizmayı harekete geçirmiş olabilir. Selüloz kontrol, düşük ve yüksek doz selüloz ile karıştırılan demir dikeni gruplarının kan kalsiyum seviyesini etkilememesi selülozdan kaynaklanabilir. Selüloza bağlanan demir dikeni bitki tozunun ince bağırsak tarafından sindirimi ve dolayısıyla emilimi gerçekleşmemiş olabilir. Selüloz kontrol ve selüloz ile karıştırılan düşük ve yüksek doz demir dikeni gruplarının kontrol (negatif) grubuna göre daha düşük plazma kolesterol seviyesine sahip oldukları gözlemlenmiştir (P<0.05). Saponin içeren *Yucca schidigera* tozu ile beslenen bıldırcınlarda serum kolesterol seviyesinin düştüğü belirlenmiştir (Kaya ve ark., 2003). Mevcut çalışmamızda ise, saponin kaynağı olan demir dikeni bitki tozunun selüloz ile karıştırılmasına rağmen elde edilen bu sonuç yukarıdaki sonuç ile paralellik göstermektedir.

Plazmadaki etkinin kemiğe yansımadığı rasyonun kalsiyum düzeyinin optimum düzeyde olması ve kemiklerde yeteri kadar kalsiyum bulunması plazmada kalsiyum düzeyinin yüksekliğini açıklayabilir.

Tablo 4. Rasyona farklı düzeylerde ve farklı materyallerle karıştırılarak eklenen Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun yumurta tavuklarında verim performansı üzerine etkileri.

Table 4. The effects of plant powder of Tribulus terestris with different materials combinations on the production performance of laying hens.

Parametre	Kümülatif Yem Tüketimi, Yumurta Verimi, Yumurta Kütlesi ve Yem Dönüşüm Oranı Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) Tozu Düzeyleri (g kg^{-1})												SED	UYG	DOZ	UYG X DOZ
	Yalın			Bentonit			Selüloz			Yağ						
Doz	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2				
DBCA (g)	1415.9	1415.8	1415.8	1415.9	1415.8	1415.9	1415.8	1415.8	1415.9	1415.8	1415.8	1415.8	9.48	1.00	1.00	1.00
DSCA (g)	1442.40	1404.88	1388.63	1390.93	1411.88	1408.88	1388.80	1429.88	1391	1431.73	1446.75	1401.50	10.82	0.86	0.59	0.94
DSCAD(g)	23.20	-10.87	-27.12	-28.53	-3.87	-7.00	-19.87	14.13	-24.88	21.73	31.00	-14.25	5.40	0.36	0.13	0.41
YT (0-4)	2514.1^{bcd}	2293.9^{de}	2432.4^{cde}	2994.7^{a}	2444.2^{cde}	2589.6^{bc}	2355.5^{cde}	2489.8^{bcd}	2219.9^{e}	2742.9^{b}	2612.1^{bc}	2607.9^{bc}	27.43	0.001	0.001	0.004
YV (0-4)	25.31	24.60	24.50	24.44	24.27	25.88	23.75	23.63	23.38	24.88	24.00	24.13	0.24	0.09	0.92	0.81
YK (0-4)	1422.3^{abc}	1387.3^{abc}	1383.8^{abc}	1469.3^{ab}	1419.1^{abc}	1472.5^{ab}	1353.5^{abc}	1351.7^{bc}	1329.4^{c}	1485.7^{a}	1400.2^{abc}	1442.1^{abc}	11.84	0.004	0.32	0.93
YDO (0-4)	1.77^{bc}	1.67^{c}	1.76^{bc}	2.06^{a}	1.73^{bc}	1.77^{bc}	1.74^{bc}	1.84^{bc}	1.67^{bc}	1.85^{bc}	1.87^{ab}	1.81^{bc}	0.02	0.04	0.09	0.01
YT (4-8)	2430.9^{b}	2408.7^{b}	2614.3^{ab}	2690.5^{ab}	2553.9^{ab}	2554.3^{ab}	2500.9^{ab}	2561.8^{ab}	2449.5^{ab}	2759.2^{a}	2671.8^{ab}	2558.4^{ab}	28.11	0.05	0.71	0.40
YV (4-8)	26.13^{a}	25.14^{ab}	26.19^{a}	25.88^{ab}	26.26^{a}	26.06^{a}	24.88^{ab}	25.19^{ab}	23.88^{b}	26.06^{a}	25.69^{ab}	24.20^{ab}	0.19	0.03	0.32	0.36
YK (4-8)	1474.0^{abcd}	1444.7^{cd}	1504.3^{abc}	1568.4^{ab}	1516.2^{abc}	1496.6^{abc}	1422.0^{cd}	1468.9^{bcd}	1366.0^{d}	1593.1^{a}	1533.5^{abc}	1443.1^{cd}	11.50	0.01	0.07	0.16
YDO (4-8)	1.65	1.66	1.74	1.73	1.68	1.72	1.77	1.76	1.82	1.73	1.75	1.77	0.02	0.27	0.49	0.99
YT (0-8)	4945.1^{cd}	4702.6^{d}	5046.7^{bcd}	5685.2^{a}	4998.1^{bcd}	5143.9^{bcd}	4856.5^{cd}	5051.6^{bcd}	4669.4^{d}	5502.1^{ab}	5283.9^{abc}	5166.3^{bcd}	51.42	0.001	0.07	0.10
YV (0-8)	51.44	48.47	50.69	50.31	50.53	51.94	48.63	48.81	47.25	50.94	49.69	46.81	0.42	0.11	0.47	0.36
YK (0-8)	2896.3^{abcd}	2832.0^{bcd}	2888.1^{abcd}	3037.8^{ab}	2935.3^{abc}	2969.1^{abc}	2775.5^{cd}	2820.6^{cd}	2695.4^{d}	3078.8^{a}	2933.8^{abc}	2885.2^{abcd}	20.04	0.001	0.16	0.62
YDO (0-8)	1.71	1.66	1.75	1.87	1.70	1.73	1.75	1.79	1.73	1.79	1.80	1.79	0.02	0.23	0.61	0.37

DBCA: Deneme Başı Canlı Ağırlık (g), ***DSCA:*** Deneme Sonu Canlı Ağırlık (g), ***DSCAD:*** Deneme Süresi Canlı Ağırlık Değişimi (g), ***YT:*** Yem Tüketimi, ***YV*****:** Yumurta Verimi (adet), ***YK*****:** Yumurta Kütlesi (g), ***YDO:*** Yem Dönüşüm Oranı (g yem:g yumurta kütlesi)

a-d: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Tablo 5. Rasyona farklı düzeylerde ve farklı materyallerle karıştırılarak eklenen Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun yumurta tavuklarında yumurta kalite kriterleri üzerine etkileri.

Table 5. The effects of plant powder of Tribulus terestris with different materials combinations on the quality criteria of egg of laying hens.

Parametre	Yumurta Kalite Kriterleri												SED	UYG	DOZ	UYG X DOZ
	Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) Tozu Düzeyleri (g kg^{-1})															
	Yalın			Bentonit			Selüloz			Yağ						
Doz	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2				
Yumurta Ağırlığı (g adet^{-1})	57.86	58.33	57.55	57.81	58.26	57.15	56.25	57.67	58.04	59.46	60.12	56.64	0.19	0.13	0.11	0.52
Şekil İndeksi (En/Boy)	73.95^{abc}	73.97^{ab}	73.66^{abc}	73.58^{abc}	72.41^{d}	73.28^{bcd}	73.20^{bcd}	73.84^{abc}	74.04^{abc}	73.07^{bcd}	73.03^{cd}	74.55^{a}	0.11	0.56	0.05	0.08
Kuru Kabuk ağ. (g)	5.21^{bc}	5.16^{c}	5.21^{bc}	5.28^{abc}	5.12^{c}	5.18^{c}	5.09^{c}	5.07^{c}	5.14^{c}	5.43^{ab}	5.45^{a}	5.08^{c}	0.02	0.02	0.02	0.49
Ak Ağırlığı (g)	34.23	34.78	34.25	34.25	35.13	34.25	32.95	34.72	35.39	35.16	36.18	33.69	0.18	0.13	0.32	0.24
Sarı Ağırlığı (g)	16.34^{ab}	16.23^{ab}	16.04^{abc}	16.15^{abc}	15.70^{bc}	15.70^{bc}	16.02^{abc}	15.79^{bc}	15.47^{c}	16.50^{a}	16.23^{ab}	15.67^{bc}	0.06	0.39	0.001	0.52
Ak İndeksi	5.39^{ab}	5.70^{ab}	5.78^{a}	5.28^{ab}	6.03^{a}	5.63^{ab}	5.05^{b}	5.51^{ab}	5.87^{a}	5.35^{ab}	5.66^{a}	5.81^{a}	0.07	0.71	0.001	0.43
Sarı İndeksi	37.84^{ab}	36.59^{b}	37.70^{ab}	37.39^{ab}	39.32^{a}	37.69^{ab}	37.18^{ab}	37.63^{ab}	38.32^{ab}	38.84^{ab}	38.14^{ab}	37.70^{ab}	0.30	0.92	0.01	0.15
Haugh Birimi	79.24^{abc}	81.93^{abc}	81.92^{abc}	79.12^{abc}	83.51^{a}	82.25^{abc}	77.88^{c}	80.95^{abc}	82.16^{ab}	78.83^{abc}	81.43^{abc}	82.87^{a}	0.42	0.49	0.001	0.40
Yumurta Kabuk Kalınlığı (µm)																
Ortalama	286.7	290.6	292.9	289.0	285.9	294.4	291.0	282.6	289.2	288.6	293.8	282.4	0.69	0.54	0.65	0.10

a-d: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Tablo 6. Rasyona farklı düzeylerde ve farklı materyallerle karıştırılarak eklenen Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun yumurta tavuklarında yumurta sarısı kolesterolü (mg/g) üzerine etkileri.

Table 6. The effects of plant powder of Tribulus terestris with different materials combinations on the egg yolk cholesterol of laying hens.

Parametre	Yumurta Sarısı Kolesterol Düzeyi												SED	UYG	DOZ	UYG X DOZ
	Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) Tozu Düzeyleri (g kg^{-1})															
	Yalın			Bentonit			Selüloz			Yağ						
Doz	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2				
Deneme Başı	218.3	281.6	242.8	237.2	247.6	234.5	233.7	230.0	233.8	276.2	251.5	212.8	7.78	0.92	0.63	0.70
Deneme Ortası	248.7	306.6	263.4	275.5	235.7	251.6	273.9	325.2	290.9	282.7	284.4	265.5	7.74	0.33	0.54	0.65
Deneme Sonu	248.8	244.8	299.4	257.8	239.2	219.8	249.5	244.9	220.4	249.3	234.5	301.6	7.39	0.46	0.56	0.34

Sonuç

Yalın olarak kullanılan Demir dikeni (*Tribulus terrestris*) bitki tozunun yumurta sarısı kolesterol değerlerinin yurt dışında yapılan çalışmalar (Grigorova ve ark., 2008a; 2008b; 2009) gibi muamele gruplarında önemli bulunamaması (P>0.05), bitki tozu doz miktarının az olması, taşıyıcı materyalinin karakteri, iklimsel farklılık ve bitki ekstrakte yönteminden kaynaklanmış olabilir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak demir dikeni bitkisinin yem katkısı olup olamayacağı daha ileri düzeyde biyolojik çalışmalarla ortaya konulmalıdır.

Bugün dünyada alternatif yem katkılarının et ve yumurta verimi üzerine yapılan çalışmalar hızla devam etmekte ve ticari olarak satışı yapılan birçok doğal yem katkı maddesi piyasada bulunmaktadır. Bu ürünlerin birçoğu ülkemize ithal edilmektedir. Bu ürünlerin ithalatı ülkemize döviz kaybı olarak yansımaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler yönünden eşsiz zenginliğe sahip olan ülkemizde et ve yumurta kalitesi ile verimine yönelik yem katkı maddeleri üretiminin gerçekleştirilebilmesi için daha çok çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilecek olumlu sonuçlar ile alternatif yem katkılarının ithalatının önüne geçilebilecek hatta bu ürünlerin ihracatı bile gündeme gelebilecektir. Ayrıca et ve yumurtanın üretimindeki verim artışına paralel, besin bileşiklerindeki tüketim yönünden iyileştirmede tüketicilerin daha fonksiyonel gıdalarla beslenmesine katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma doktora tezinden özetlenmiş olup tez MKÜBAP tarafından 01 D 0102 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Anonim (2011): Antioksidanların yararları nelerdir? Erişim: http://www.hastane.com.tr/saglik/antioksidanlarin-yararlari-nelerdir.html (erişim: 04.01.2011).

Anonymous, (1989): Boehringer Manheim GmbH iochemica.: Methods of biochemical analysis and food analysis. Manheim, Germany, p. 26-28.

Avcı, G., Küçükkurt, İ., Kontaş, T., Eryavuz, A., Fidan, A.F. (2007): Tavşanlarda rasyona ilave edilen farklı miktarlardaki Yucca Schidigera ekstraktının (De-Odorase®) bazı serum makro ve mikro element düzeylerine etkisi. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner)*, 21(6): 257-262.

Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F. (1987): Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metodları II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakütesi Yayınları No: 1021, Ankara.

Grigorova, S., Kashamov, B., Sredkova, V., Surdjiiska, S., Zlatev, H. (2008a): Effect of Tribulus terrestris extract on semen quality and serum total cholesterol content in White Plymouth Rock-mini cocks. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 24(3-4): 139-146.

Grigorova, S., Vasileva, D., Kashamov, B., Sredkova, V., Surdjiiska, S. (2008b): Investigation of Tribulus terrestris extract on the biochemical parameters of eggs and blood serum in laying hens. *Archiva Zootechnica*, 11(1): 39-44.

Grigorova, S., Abadjieva, D., Nikolova, M. Penkov, D. (2009): The effect of Tribulus terrestris extract on egg yolk lipids and serum cholesterol content in guinea fowls. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6): 1109-1115.

Heitner, C., Min, T. (1987): The effect of sulphite treatment on the brightness and bleachability of chemithermomechanical pulp. Proceedings of the 4th International Symposium of Wood and Pulping Chemistry, Paris, France, 1: 327-332.

Jenkins, K.J., Atwal, A.S. (1994): Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols and availability of vitamin A and E in chicks. *The Journal of Nutitional Biochemistry*, 5: 134-137.

Jones, J.B., Case, V.W. (1990): Soil Testing and Plant Analysis (Third Edition) (SSSA Book Series: 3). In: Westerman, R.L. (Ed.). Analyzing Plant Tissue Samples. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin.

Kamel, C. (2001): Natural Plant Extracts: Classical Remedies Bring Modern Animal Production Solutions. In: Brufau, J. (Ed). Feed Manufacturing in the Mediterranean Region. Improving Safety: from Feed to Food. Ciheam-Iamz Press, Zaragoza, pp. 31-38.

Kaya, Ş., Erdoğan, Z., Erdoğan, S. (2003): Effect of different dietary levels of Yucca schidigera powder on the performance, blood parameters and egg yolk cholesterol of laying quails. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(1): 14-17.

Kutlu, H.R. (2001): Yemler Bilgisi ve Yem Teknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü (Hayvansal Üretim Lisans Programı), Ders Notu, Adana.

Kutlu, H.R. (2007): Büyüme Uyarıcı Antibiyotiklere Karşı Seçenek Aranıyor. Cumhuriyet / Tarım, 13.02.2007, s. 19.

Özgüven, M., Engin, M. (2000): Bitki Fizyolojisi Uygulama Kılavuzu. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu, Adana.

Pahsa, T.N., Farooq, M.U., Khattak, F.M., Jabbar, M.A., Khan, A.D. (2007): Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 132(1-2): 103-110.

SAS (1996): SAS User' s Guide: Statistics, 1996 edit. SAS Institue, Inc., Carry, NC.

Şahin A. (2009): Effects of dietary Tribulus terrestris L. Powder on growth performance, body components and digestive system of broiler chicks. *Journal of Applied Animal Research*, 35(2): 193-195.

Tipu, M.A., Akhtar, M.S., Anjum, M.I., Raja, M.L. (2006): New dimension of medicinal plants as animal feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(3): 144-148.

Toker, E., Zincirlioğlu, M., Alarslan, Ö.F. (1998): Hayvan Yetiştirme (Yemler ve Hayvan Besleme). Baran Ofset, Ankara.

1(2): 94-102 (2015) doi: 10.3153/JFHS15009

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

REVIEW ARTICLE DERLEME MAKALESİ

METABOLİK DÜZENLEYİCİ BİLEŞENLERİN ve BAZI YEM KATKILARININ KARKAS KOMPOZİSYONU ve ET KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Müge AKKARA, Neriman BAĞDATLIOĞLU

Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa-Türkiye

Received: 19.01.2015

Accepted: 06.02.2015

Published online: 09.02.2015

Corresponding author:

Müge AKKARA, Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa-Türkiye

E-mail: muge.akkara@cbu.edu.tr

Öz:

Son yıllarda yapılan çalışmalar gıdaların kalitesinin hayvanlara verilen yemin kalitesi ile yakından ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Giderek artan dünya nüfusu ve yaşam standardının yükselmesi fazla miktarda ve iyi nitelikli hayvansal kaynaklı besinlerin üretilmesini zorunlu kılmaktadır. Bunu sağlamak için, hayvanların bakım ve beslenmesi ile genetik yapısının iyileştirilmesi yanında, besi durumu ve verimlerini arttırmak amacıyla yem katkı maddelerinin kullanılması önemli yer tutmaktadır. Etin besin değeri genel olarak birçok metabolik düzenleyicinin kullanımı ile gelişmektedir. Literatürde birçok çalışmada metabolik düzenleyicilerin büyüme oranını arttırdığı, beslemenin etkinliğini geliştirdiği, lif oranını arttırdığı ve yağlılık oranını azalttığı ifade edilmektedir. Metabolik düzenleyici bileşenler yem katkı maddesi olarak kullanılabilen veya aşı şeklinde uygulanan bileşiklerdir. Başta hayvansal üretim ve hayvan refahının iyileştirilmesi, yemin besin değerinin arttırılması ve hayvansal üretim sırasında çevreye verilen zararın azaltılması yem katkılarının ve bu metabolik bileşenlerin etkin ve kontrollü kullanımı ile mümkün olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler:

Metabolik düzenleyici bileşen, Yem, Katkı maddesi

Abstract:

The Effects of Metabolic Modifiers and Some Feed Additives on Carcass Composition and Meat Quality

In recent years, studies have revealed that the quality of foods is closely related to the quality of feed given to animals. An increasing world population and the living standard have required the production of excess and good quality foods of animal origin. To achieve this, besides the animal care and nutrition and the improvement of their genetic structure, using of feed additives is important in order to increase nutrient availability and efficiency. The nutritional value of meat has generally improved with the use of many metabolic modifiers. Many studies in literature have showed that metabolic modifiers increase growth performance, improve feed efficiency, increase fibre ratio and decrease fat ratio. Metabolic modifiers are compounds that are either used as feed additive or implemented as vaccine. It has been predicted that the improvement of animal production and animal welfare, increasing of the nutritional value of feed and reducing damage to the environment will be possible with the effective and controlled use of these metabolic components.

Keywords:

Metabolic modifiers, Feed, Additive

Giriş

Metabolik düzenleyici bileşenler canlı hayvanlara yem katkı maddesi olarak verilen, enjekte edilen veya aşı olarak uygulanan karkas verimliliğini arttırmak, yemin daha verimli kullanımını sağlamak, etin raf ömrünü uzatmak, besin değerini arttırmak ve lezzetini geliştirmek amaçlı kullanılan bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Metabolik bileşenlerin çoğu büyüme oranını ve karkas kompozisyonunu arttırmak için kullanılırken sadece bir kısmı et kalitesinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Dikemen, 2007).

Resim 1. Metabolik düzenleyici bileşen içeren farklı yem katkıları

Photo 1. Different feed additives containing metabolic modifiers

Metabolik düzenleyici bileşenler karkas verimliliğini arttırmanın yanında yağ oranını da azaltmaktadır. Literatürdeki çalışmalar metabolik düzenleyicilerin kesme kuvvetini arttırdığını dolayısıyla gevrekliği azalttığını ifade etmektedir. Birçok faktörün bu durumda etkili olduğu tartışılmaktadır. Ancak bazı metabolik düzenleyicilerin tek başlarına ya da bazı yem katkılarıyla birlikte kullanımının et kalitesinin korunmasında ve geliştirilmesinde etkili olacağı belirtilmektedir (Dunshea ve ark., 2005). Günümüzde değişik başlıklar altında sınıflandırma yapılmak suretiyle yüzlerce yem katkısı kullanılmaktadır (Türkmen ve ark., 2011). Bu derlemede, karkas kompozisyonu ve et kalitesi üzerine potansiyel etkileri bulunan metabolik düzenleyici bileşenlerin ve bazı yem katkılarının etkisi tartışılacaktır.

Anabolik Steroidler

Anabolik steroidler, hayvanlarda karkas boyutuna ve kuvvetine etki eden büyümeyi destekleyici ve iyileştirici ajanlar olarak kullanılmaktadır. Ancak hayvanlarda doğal ve yapay anabolik steroidlerin kullanımı halk sağlığına toksik etkilerinden dolayı birçok ülkede yasaklanmıştır. Bu yüzden bu bileşenlerin besinlerde kalıntı miktarlarının belirlenmesi ve izin verilen yasal miktarlarda kullanımına dikkat edilmesi gerekmektedir (Fuh ve ark., 2004).

Steroidler özellikle sığır yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan metabolik düzenleyici bileşenlerdir. Bu bileşenler östrojenik, androjenik ve progestinik olarak sınıflandırılmaktadır (Johnson ve Reinhardt, 2009). Çeşitli anabolik steroidleri içeren aşılar sığır endüstrisi tarafından büyüme hızını arttırmak ve daha verimli yem kullanımını sağlamak gibi ekonomik gerekçelerden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Dikeman, 2003). Preston (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, anabolik steroid aşılarının sığırlarda ve koyunlarda büyüme hızını %10-30 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun yanında anabolik steroid aşılar yem verimliliği ve karkas yağ oranı üzerine de etkili olmaktadır. Anabolik steroidlerin hem ucuz olması hem de sığır üretim verimliliğini arttırması avantaj sağlamaktadır (Dikeman, 2003) .

Östrojenler, büyüme hızını arttıran temel bileşenlerdir. Ticari östrojen bileşenleri olarak estradiol ve benzoat esteri ve zeranol kullanılmaktadır. Ayrıca trenbolon asetat, testosteron ve progesteron gibi diğer bileşenler ile kombine kullanılarak büyüme hızına etkisi arttırılmaktadır (Preston, 1999).

Östrojenik ve androjenik steroidlerin kaslarda protein sentezi ve birikim oranını arttırdığı ve/veya protein degradasyonunu azalttığı da ifade edilmektedir. Ayrıca, canlı hayvanda bu bileşenlerin yağ miktarını azalttığı tespit edilmiştir (Dunshea ve ark., 2005).

Sığır endüstrisinde trenbolon asetat içeren karışım aşılar "agresif" olarak adlandırılmaktadır. Anabolik steroidlerin agresif kullanımı genellikle sığır kalite sınıflarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle sığırların "agresif" aşılama teknikleriyle aşılanması önerilmemektedir (Dikeman, 2003).

Anabolik steroidlerin kanatlılar, koyun ve domuzlar üzerine etkisi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda araştırma vardır. Ancak Lee ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada domuzlara aşılama yapılmış ve domuz eti kalitesinin aşıdan etkilenmediği ancak sırt yağında aşı ile birlikte azalma meydana geldiği tespit edilmiştir.

Vitaminler

D_3 Vitamini

Hayvan yemlerine D_3 vitamini ilavesinin etin gevreklik gelişimi üzerine etkili olduğu ifade edilmektedir. D_3 vitamininin kaslarda ve kanda kalsiyum seviyesini arttırdığı belirlenmiştir (Dikemen, 2007). Kaslarda kalsiyum düzenleyicisi olarak rol oynadığı ve kalsiyum absorbsiyonu için gerekli olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca yeme katılan D_3 vitamininin kaslarda daha fazla miktarda kalsiyum birikimine sebep olacağı ve dolayısıyla kesim sonrası kalpain aktivitesini arttırabileceği düşünülmektedir (Boleman ve ark., 2004).

Hansen ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada genç sığırlara zilpaterol hidroklorür ile yüksek dozda D_3 vitamini verilmiştir. Elde edilen sığır etlerinin renk stabilitesinin geliştiği, protein oksidasyonuna karşı daha yüksek stabiliteye sahip olduğu ve lipid oksidasyonuna karşı ise düşük stabilite gösterdiği tespit edilmiştir.

Montgomery ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, kesimden hemen önce yüksek düzeyde vitamin D_3 takviyesinin etin gevrekliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Lawrence ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise kesim öncesi sığırlara vitamin D_3 takviyesinin kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı kesim sonrası kalıntı kalpaini aktive ettiği ve postmortem glikozisi hızlandırdığı bunun sonucu olarak da gevreklik gelişimini sağladığı ifade edilmiştir.

Aşırı D_3 vitamini alımının toksisiteye sebep olarak kemiklerde kireçlenmeyi arttırabileceği ifade edilmektedir. Bu nedenle bu konuda daha fazla araştırma yapılarak D_3 vitamininin insan sağlığını bozucu risk oluşturmadığı kanıtlanana kadar et kalitesini geliştirmek için metabolik düzenleyici bileşen olarak hayvan yemlerine ilavesinin endüstri tarafından tercih edilmeyeceği düşünülmektedir (Tripton ve ark., 2007).

A Vitamini

A vitamininin aktif provitamini β-karotendir ve bitkisel dokularda sentezlenmektedir. β-karotenin vitamin A'ya dönüşme oranı civcivlerde 2:1, koyunlarda 6:1, sığırlarda ise 8:1 şeklindedir. Bu nedenle, hayvanların A vitamini ihtiyacı hesaplanırken β-karotenin A vitaminine dönüşme oranı göz önüne alınmaktadır. Hayvan türlerine göre A vitamin ihtiyacı farklılık göstermektedir (Türkmen ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalar yağda çözünen vitaminler arasında yer alan A vitaminin sığır eti kalitesi üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Sığır rasyonlarına A vitamini takviyesinin büyüme oranını önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca lipid ve pigment oksidasyonunu azalttığı ve sığır etinin gevrekliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2007). A vitaminin mermerleşme üzerine de etkisi olduğu ifade edilmektedir. Yüksek düzeyde A vitamini takviyesinin mermerleşme üzerine etkisinin sığırlarda olgunlaşmaya bağlı olarak değişim gösterdiği ifade edilmektedir. Oka ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan bir çalışmada 15 aylık olan genç sığırlara verilen A vitamini katkısının deri altında yağlanmayı arttırmadan mermerleşme skorunu yükselttiği tespit edilmiştir. Ancak 21-23 aylık sığırlarda aynı durum gözlenmemiştir. Mermerleşme lezzet açısından önemli bir kalite faktörüdür.

Çalışmalarda A vitamininin büyüme oranına, yem alım miktarına ve karkas kompozisyonuna önemli bir etki göstermediği belirtilmektedir. Ancak A vitaminin bir formu olan retinoik asitin büyüme hormonu gen ekspresyonunu düzenleyici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Dikeman, 2007). Ayrıca A vitamininin büyüme hormonu salgılama sistemini düzenleyici etki gösterdiği dolaylı yoldan mermerleşme gelişimini etkilediği ifade edilmektedir. Çünkü, büyüme hormonunun doğrudan memerleşme skorunu düşürdüğü tespit edilmiştir (Dalke ve ark., 1992).

E Vitamini

E vitamini biyolojik bir antioksidan olup, dokularda peroksitlerin birikimini önlemekte ve yağların stabil kalmalarını sağlamaktadır. Aynı özelliği nedeniyle yemlere katılarak yağların stabil kalmaları ve acılaşmaları önlenebilmektedir (Muğlalı ve ark., 2002).

Hayvan rasyonlarına eklenen E vitamininin en yaygın ticari şekli, α-tokoferolün asetat esterleridir. Ancak, gastrointestinal kanalda deesterifiye edilinceye kadar bir antioksidan gibi fonksiyon göstermemektedir. E vitamini hayvan organizmalarında sentez edilemediğinden, hayvan dokularındaki E vitaminin varlığı sadece diyetle aldıkları miktarı yansıtmaktadır. E vitamininin yağda çözünebilme özelliği yüzünden bu vitaminin absorbsiyonu hayvanların sindirdikleri yağ oranı ile ilişkilidir (Konyalıoğlu, 2001).

Konyalıoğlu (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, diyete E vitamini eklenmesi ile et ve et ürünlerinde lipid oksidasyon düzeylerinin azaldığı ifade edilmiştir. Buckley ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise α-tokoferol uygulamasının et kalitesini düzelttiği ve depolama boyunca oksidatif stabiliteyi koruduğu tespit edilmiştir.

Birçok çalışmada, yem katkısı olarak E vitamini kullanımının kırmızı ve beyaz etlerin kalitesi üzerine yararlı etkilerinin olduğu ifade edilmektedir. Sığır etinde lipid ve renk stabilitesinin sağlanması (Arnold ve ark., 2003), hindi etinde renk gelişimi (Sante ve Lacourt, 1994), domuz eti dilimlerinde depolama sürecinde damlama kaybının azalması (Asghar ve ark., 1991) E vitamini katkılı yemlerin kullanımı ile tespit edilmiştir. Ayrıca domuzlarda E vitamini katkılı yem kullanımının *longissimus thoracis* kasında su tutma kapasitesini azalttığı ve PSE et oluşumunu engellediği saptanmıştır (Cheah ve ark., 1995).

Ripoll (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, E vitamini katkılı yem kullanımının kuzu etlerinin raf ömrünü arttırdığı tespit edilmiştir. Macit (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, yeme E vitamini ilavesinin kuzu etinde lipid oksidasyonunu, damlama kaybını önemli ölçüde azalttığı ve etin renk stabilitesini koruduğu ifade edilmiştir.

Genel olarak E vitamininin domuz ve kanatlı eti ürünlerinde renk stabilitesi üzerine daha az etki gösterdiği, sığır ve kuzu etlerinde belirgin ölçüde stabiliteyi etkilediği saptanmıştır. Bu yüzden metabolik düzenleyici bileşen olarak E vitamini kullanımının renk üzerine etkisinin myoglobin miktarına bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir (Guidera ve ark., 1997).

Somatotropin

Somatotropin doğal olarak oluşan ve ön hipofiz salgı bezi tarafından üretilip kan dolaşımına katılan protein yapısında bir hormondur (Dikeman, 2003). Bir büyüme hormonu olan somatotropin hormonu rDNA teknolojisi ile mikroorganizmalar tarafından oldukça saf olarak üretilebilmektedir (Türkmen ve ark., 2011).

Somatotropinin etkileri üzerine yapılan ilk çalışma, geviş getiren hayvanlar üzerinde yapılmıştır ve sığırlara göre daha fazla gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Günümüze dayanan çalışmalarda ise rekombinant büyüme hormonu içeren peletler veya enjeksiyonların sığırlarda ve koyunlarda yem verimliliği ve kazancı arttırdığı, yem alımını azalttığı veya etkilemediği, karkas protein miktarını arttırdığı, yağ oranının azalttığı, plazma veya serumda üre miktarını azalttığı, kandaki büyüme hormonu seviyesini arttırdığı ve önemli ölçüde insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) konsantrasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Preston, 1999). Ayrıca somatotropin hormonunun steroid yapılı aşılar ile birlikte kullanımı da mevcuttur (Wolfrom ve ark., 1985) .

Domuzlara somatotropin hormonu uygulamasının kas kütlesinde artışla beraber yağ oranının azalttığı, karkas kompozisyonunu geliştirdiği bilinmektedir. Ancak domuzlara somatotropin uygulamasının farklı cinsiyetlerden farklı sonuçlar alınabileceği düşüncesiyle uygulama şeklinin ve dozunun maksimum sonuçlar için bu faktörler ele alınarak yapılmasının gerekli olduğu ifade edilmektedir (Aalhus ve ark., 1996).

β-agonistler

β-agonistler, yem verimliliğini sağlamak, kazancı arttırmak ve karkas et verimliliğini geliştirmek için yem katkısı olarak kulanılan bileşiklerdir (Hope-Jones ve ark., 2010). Yağ ve kas hücrelerinin yüzeylerine bağlanarak doku gelişiminde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları düzenleyici bileşiklerdir (Strydom ve ark., 2009).

β-agonistler, hücrelerde lipogenezis ve protein degradasyonunu azaltıp lipolizisi ve protein sentezini arttırıcı olarak rol oynamaktadır (Hope-

Jones ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda sığırlarda, koyunlarda ve domuzlarda karkas gelişimi üzerine pozitif etkilerinin olduğu ve karkas verimliliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Fiems, 1987).

β-agonist bileşiği olarak raktopamin hodrokloridin domuzlarda büyüme oranı, yem verimliliği, ağırlık ve karkas kompozisyonu üzerine pozitif etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (Dikeman, 2007). McKeith ve arkadaşları (1995) sığır eti ve domuz etinin görsel kalitesi ve duyusal özellikleri üzerine raktopamin hipokloridin etkilerini araştırmış ve her iki türde mermerleşme, renk ve sertlik üzerine nötürden pozitife doğru değişen bir etki gösterdiğini ifade etmiştir.

Diğer bir sentetik β-agonist bileşiği olan zilpaterol son zamanlarda Meksika, Kuzey Afrika ve USA ülkelerinde ağırlık artışı, yem verimliliği ve karkas yağ oranının azaltılması için kullanılmaktadır (Dikeman, 2007). Avendano-Reyes ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, kesim öncesi 33 gün boyunca zilpaterol katkılı yem ile beslenen öküzlerin büyüme performansı, karkas özellikleri ve et kalitesi üzerine zilpaterolün etkisi araştırılmıştır. Sıcak karkas ağırlığında artış gözlemlenmiş ve kontrol grubuna göre kesme kuvveti değerleri yüksek çıkmıştır. Ayrıca, renk üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, raktopamin ve zilpaterolün etkileri karşılaştırılmıştır. Raktopamin içeren yemler ile beslenen öküzlerde yağ kalınlığının zilpaterol içeren yemler ile beslenen öküzlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kesme kuvvetlerinde ise benzer sonuçlar alınmıştır.

β-agonistlerin kullanımının inhibitör kalpastatin aktivitesinde artışa dolayısıyla kalpain aktivitesinde ise azalmaya sebep olmasından dolayı etin sertliğini arttırdığı bilinmektedir. Bu değişimler cinse, kas türüne, uygulama süresine ve kullanılan bileşiğe bağlı olarak değişmektedir. Etin gevrekliği ile ilgili bu problemlerin β-agonistlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hope-Jones ve ark., 2010). Ancak bu negatif etkilerin elektriksel stimülasyon uygulaması, olgunlaştırma veya diğer mekaniksel yöntemler ile azaltılabileceği ifade edilmektedir (Dikeman, 2007).

Konjuge Linoleik Asit

Konjuge linoleik asit, linoeik asitin çift doymamış konjuge bağ içeren pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımıdır (Köknaroğlu, 2007). Linoleik asitten köken alan, antikanserojenik, bağışıklığı arttırıcı ve vücut yağlarını azaltıcı özelliklere sahip olan bir yağ asitidir (Türkmen ve ark., 2011). Diğer gıdalarda da bulunmasına karşın, ruminantlardan elde edilen ürünlerde konjuge linoleik asit miktarı yüksek düzeydedir ve bu ürünler diyette bulunan lonjuge linoleik asitin ana kaynağıdır (Köknaroğlu, 2007).

İnsan beslenmesinde et ve süt ürünlerinin konjuge linoleik asitin temel kaynağı olmasının bilinmesiyle, bu ürünlerin konjuge linoleik asit konsantrasyonunun nasıl arttırılabilecegi konusunda çalışmalar başlatılmıştır. Yapılan çalışmalar, ruminant hayvanların beslenmesinde doymamış yağ asidi ve bitkisel yağların kullanılmasıyla sütte bulunan konjuge linoleik asit konsantrasyonunun arttırılabilecegini göstermiştir (Özsan, 2005).

Yıldırım (2011) tarafından yapılan bir çalışmada etlik piliçlerin rasyonlarına farklı oranlarda konjuge linoleik asit ilave edilmiş rasyondaki konjuge linoleik asit oranının artmasıyla piliç etindeki yağ ve kolesterol miktarının düştüğü, konjuge linoleik asit miktarının ise arttığı tespit edilmiştir. Du ve Ahn (2002) tarafından yapılan başka bir çalışmada, broyler yemlerine ilave edilen konjuge linoleik asidin pişmiş etlerde oksidasyona karşı dayanıklılığı arttırdığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, konjuge linoleik asitin erime noktası yüksek olması nedeniyle yağ asidi kompozisyonundaki değişimin yağların erime noktasının artmasına sebep olduğu ve dolayısıyla etin sertliğini arttırdığı ifade edilmiştir.

Konjuge linoleik asitin geviş getirmeyen hayvan yemlerine ilavesi kaslarda konjuge linoleik asit miktarını arttırdığı ve yağ asidi profilini değiştirdiği ifade edilmektedir. Bu nedenle etin konjuge linoleik asit miktarını arttırmak ve konjuge linoleik asitin biyolojik etkilerinden yararlanmak için yem katkılarına ilave edilmesinin uygun olacağı öngörülmektedir (Zhang ve ark., 2010).

Diğer Yem Katkıları

Metabolik düzenleyici bileşenlerin yanında iz miktarlarda hayvan yemlerine ilave edilen bileşenler de mevcuttur. Bu bileşenlerden krom, karnitin, magnezyum, niasin, manganez, selenyum ve betain üzerine çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür (Dikeman, 2007; Dunshea ve ark., 2005).

Krom, metabolizma için esansiyel bir iz elementtir (Dikeman, 2007). Boleman ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan bir çalışmada domuz yemlerine krom ilavesinin kas miktarını arttırdığı, sırt yağını azalttığı, gevreklik ve duyusal özellikler üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Karnitin, vitamin benzeri bir bileşiktir ve uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınmasında rol oynamaktadır (Dikeman, 2007). Owen ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, domuz yemlerine ilave edilen L-karnitinin büyüme performansını etkilemeden sırt yağı kalınlığını azalttığı tespit edilmiştir.

İnorganik bir kaynak olan magnezyumun yem katkısı olarak kullanımının kuzu etinin duyusal özelliklerini geliştirdiği tespit edilmiştir (Hernandez-Calva ve ark., 2013). Ayrıca çalışmalarda yemlere magnezyum ilavesinin domuz etinde renk gelişimi üzerine etkili olduğu, pH'yı arttırdığı (Otten ve ark., 1992) ve sızma kaybını azalttığı gözlemlenmiştir (Schaefer ve ark., 1993). Magnezyum ile birlikte manganez de yem katkıları olarak kullanılmakta ve magnezyuma benzer fonksiyonlar göstermektedir (Apple ve ark., 2007).

Diğer bir yem katkısı olan niasin, birçok hayvan için kritik biyokimyasal vücut fonksiyonlarına katılarak büyümeyi sağlayan bir B kompleks vitaminidir. Niasin yetersizliğinde rasyondaki metabolik enerjiden yararlanma da azalmaktadır. Ayrıca yemden yararlanma azalmakta ve büyüme hızı yavaşlamaktadır (Dikicioğlu ve ark., 2000). Real ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada niasinin yem verimliliğini arttırdığı, renk stabilitesini sağladığı, etin pH'sını yükselttiği ve fireyi düşürdüğü tespit edilmiştir. Vitamin B_3 olarak da adlandırılan niasin, canlı hücrelerde hidrojen transferinden sorumlu iki koenzimin komponenti olarak fonksiyon göstermektedir. Nikotinamin adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) adı verilen koenzimler ayrıca karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmaları ile ilgili reaksiyonlarda anahtar rol oynamaktadır (Dikicioğlu ve ark., 2000) .

Domuzlar, kanatlılar ve sığırlar üzerine yapılan birçok çalışmada, selenyumun karkas kalitesi ve gelişimi üzerine yararlı etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Close, 1999). Besi sığırlarında yapılan çalışmalar incelendiğinde organik ve inorganik selenyum katkılarının et kalitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı görülmüştür. Yapılan bir araştırmada selenyumca zengin maya veya sodyum selenit katkısının besi sığırlarında et kalitesi üzerindeki etkileri araştırılmış olup, kontrol grubundaki hayvanların karaciğerlerindeki toplam selenyum düzeyinin 0.55 mg/kg olduğu buna karşılık selenyumca zengin maya katkılı grupta 0.86 mg/kg, sodyum selenit katkılı grupta da 0.72 mg/kg olduğu ifade edilmiştir (Juniper ve ark., 2008).

Betain birçok bitki ve hayvan türlerinde doğal olarak bulunan bir bileşendir. Betainin karkas kompozisyonu ve büyüme performansı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sığır yemlerine betain ilavesinin hücreler arası lipid içeriğini ve böbrekleri saran yağ kalınlığını azalttığı tespit edilmiştir (Fernandez ve ark., 2000). Betainin et kalitesi üzerine etkilerine yönelik literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ancak betain bazı ülkelerde domuzların büyüme performansını arttırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dikeman, 2007).

Sonuç

Metabolik düzenleyici bileşenler hayvan sağlığı ve veriminin arttırılması yanında yemin daha uzun süre değerinin korunarak kullanılmasına olanak sağlayan maddelerdir. Yeme ilave edilmelerinin yanı sıra aşı uygulamaları da mevcuttur. Ancak bu bileşenlerin karkas kompozisyonu ve et kalitesi üzerine bazıları pozitif bazıları negatif etkiler gösterebilmektedir. Bu nedenle uygulama periyodunda kontrollü kulanımına dikkat edilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu bileşenlerin etkileri bazı yem katkıları ile birlikte kullanımında artabilmektedir. Et kalitesinin geliştirilmesinde bu faktörlerin göz önünde bulundurulmasının ve sınırlı miktarlarda kullanılan bu bileşenlerin daha fazla literatür çalışmalarıyla desteklenerek olumlu etkilerinin ortaya konulmasının fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Aalhus, J.L., Best, D.R., Costello, F., Schaefer, A.L., (1996): The effects of porcine, somatotropin on muscle fibre morphology and meat quality of pigs of known stress susceptibility. *Meat Science*, 45(3): 283-295.

Apple, J.K., Roberts, W.J., Maxwell Jr., C.V., Rakes, L.K., Friesen, K.G., Fakler, T.M. (2007): Influence of dietary inclusion level of manganese on pork quality during retail display. *Meat Science*, 75: 640-647.

Arnold, R.N., Arp, S.C., Scheller, K.K., Williams, S.N., Schaefer, D.M. (1993): Tissue equilibration and subcellular distribution of vitamin E relative to myoglobin and lipid oxidation in displayed beef. *Journal of Animal Science*, 71: 105-118.

Asghar, A., Gray J.I., Booren, A.M., Gomaa, E.A., Abouzied, M.M., Miller, E.R., Buckley, D.J. (1991): Effects of supranutritional dietary vitamin E levels on subcellular deposition of α-tocopherol in the muscle and on pork quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57: 31-41.

Avendano-Reyes, L., Torres-Rodriguez, V., Meraz-Murill, F.J., Perez-Linares, C., Figueroa-Saavedra, F., Robinson, P.H. (2006): Effects of two –adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot steers. *Journal of Animal Science*, 84(2): 3259-3265.

Boleman, S.L., Boleman, S.J., Bidner, T.D., Southern, L.L., Ward, T.L., Pontif, J.E., Pike, M.M. (1995): Effect of chromium picolinate on growth, body composition, and tissue accretion in pigs. *Journal of Animal Science*, 73: 2033-2042.

Boleman, C.T., McKenna, D.R., Ramsey, W.S., Peel, J.W., Savell, J.W. (2004): Influence of feding vitamin D_3 and aging on the tenderness of four lamb muscles. *Meat Science*, 67: 185-190.

Buckley, D.J., Morissey, P.A., Gray, J.I. (1995): Influence of Dietary Vitamin E on the Oxidative Stability and Quality of Pig Meat. *Journal of Animal Science*, 73: 3122-3130.

Cheah, K.S., Cheah, A.M., Krausgrill, D.I. (1995): Effect of dietary supplementation of vitamin E on pig meat quality. *Meat Science*, 39: 255-264.

Close, W.H. (1999): Organic minerals for pigs: An update. In Lyons, T.P., Jacgues, K.A. (Eds.), Biotechnology in the Feed Industry, *Proceedings of the 15th Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 51-60.

Dalke, B.S., Roeder, R.A., Kasser, T.R., Veenhuizen, J.J., Hunt, C.W., Hinman, D.D., Schelling, G.T. (1992): Dose-response effects of recombinant bovine somatotropin implants on feedlot performance in steers. *Journal of Animal Science*, 70: 2130-2137.

Dikeman, M.E. (2003): Metabolic modifiers and genetics: Effects on carcass traits and meat quality. *Brazilian Journal of Food Technology (Special issue)*, 6:1-38.

Dikeman, M.E. (2007): Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality. *Meat Science*, 77(1): 121-135.

Dikicioğlu, T., Yiğit, A.A., Özdemir, E. (2000): Niasinin yumurta verimi ve kalitesi üzerine etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Ensitüsü. Dergisi*, 40(2): 65-74.

Du, M., Ahn, D.U. (2002): Effects of dietary conjugated linoleic acid on the growth rate of live birds and on the abdominal fat content and quality of broiler meat. *Poultry Science*, 81(3): 428-433.

Dunshea, F.R., D' Souza, D.N., Pethick, D.W., Harper, G.S., Warner, R.D. (2005): Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Science*, 71(1): 8-38.

Fernandez, C., Lopez-Saez, A., Gallego, L., Fuente, J.M. (2000): Effect of source of betaine on growth performance and carcass traits in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 86(1-2): 71-82.

Fiems, L.O. (1987): Effects of β-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Annales Zootechnie*, 36(3): 271-290.

Fuh, M., Haung, S., and Lin, T., (2004). Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta*, 64(2): 408-414.

Guidera, J., Kerry, J.P., Buckley, D.C., Lynch, P.B., Morrissey, P.A. (1997): The effect of dietary vitamin E supplementation on the quality of fresh and frozen lamb meat. *Meat Science*, 45(1): 33-43.

Hansen S., Frylinck, L., Strydom, P.E., (2012): The effect of vitamin D_3 supplementation on texture and oxidative stability of beef Ioins from steers treated with zilpaterol hydrochloride. *Meat Science*, 90(1): 145-151.

Hernandez-Calva, L.M., Ramirez-Bribiesca, J.E., Guerrero-Legaretta, I., Hernandez-Cruz, L., Avendano-Reyes, L., Dominguez-Vara, I., McDowell, L. (2013): Influence of dietary magnesium and selenium level on growth-performance and carcass-meat quality in finishing diets for feedlot Pelibuey lambs. *Archiv Tierzucht*, 56(30): 303-314.

Hope-Jones, M., Strydom, P.E., Frylinck, L. Webb, E.C. (2010): The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β- agonists on meat tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 86(3): 699-705.

Johnson, B.J., Reinhardt, C.D. (2009): Growth Promotants for Beef Production: Anabolic Steroids; Performance Responses and Mode of Action. *Food Animal Practice*, pp. 643-651.

Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E., Bertin, G., (2008). Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 86(11): 3100-3109.

Konyalıoğlu, S. (2001): Et kalitesi üzerine diyetle alınan E vitamininin etkileri. *Hayvansal Üretim*, 42(2): 25-36.

Köknaroğlu, H., (2007). Beslemenin sığır eti konjuge linoleik asit miktarına etkisi. *Hayvansal Üretim*, 48(1): 1-7.

Lawrence, R.W., Doyle, J., Elliott, R., Loxton, I., McMeniman J.P., Norton, B.W., Reid, D.J., Tume, R.W. (2006): The efficacy of a vitamin D_3 metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from *Bos indicus* cattle. *Meat Science*, 72(1): 69-78.

Lee, C.Y., Lee, H.P., Jeong J.H., Baik, K.H., Jin, S.K., Lee, J.H., Sohnt, S.H. (2002): Effects of restricted feding, low-energy diet and implantation of trenbolone acetate plus estradiol on growth, carcass traits and circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in finishing barrows. *Journal of Animal Science*, 80(1): 84-93.

Macit, M., Aksakal, V., Emsen, E., Aksu, M.I., Karaoglu, M., Esenbuga, N. (2003): Effects of vitamin E supplementation on performance and meat quality traits of Morkaraman male lambs. *Meat Science*, 63(1): 51-55.

McKeith, F.K., Lan, Y.H., Beermann, D.H., (1994): Low Fat Meats. In Hafs, H.D., Zimbleman R.G. (Eds.), Sensory characteristics of meat from animals given partitioning agents. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 233-252.

Montgomery, J.L., Carr, M.A., Kerth, C.R., Hilton, G.G., Price, B.P., Galyean, M.L., Horst, R.L., Miller, M.F. (2002): Effect of vitamin D_3 suplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. *Journal of Animal Science*, 80(4): 971-981.

Muğlalı, Ö.H., Çetinkaya, N., Güler, A., Göğüş, U., Ulutürk, S. (2002): Koyunlarda E vitamini takviyesinin kan ve süt E vitamini ile süt tiyobarbiturik asit miktarı üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary&Animal Science*, 26: 901-907.

Oka, A., Maruo, Y., Miki, Takahiro, Yamasaki, T., Saito, T. (1998): Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black Cattle. *Meat Science*, 48, (1-2),159-167.

Otten, W., Berrer, A., Hartmann, S., Bergerhoff, T., Eichinger, H.M. (1992): Effects of magnesium fumarate supplementation on meat quality in pigs. *In 38th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France.

Owen, K.Q., Weeden, T.L., Nelssen, J.L., Goodband, R.D. (1992): The effect of L-carnitine additions on performance and carcass characteristics of growing-finishing swine. *Swine Day (Conference),* Manhattan, KS, pp.117-121.

Özsan, E. (2005): Diyetsel konjuge linoleik asidin erkek broilerde aşılanma sonrası oluşan katabolik etkilerinin azaltılması ve bazı organ ağırlıkları üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

Preston, R.L. (1999): Hormone containing growth promoting implants in farmed livestock. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(2): 123-138.

Ripoll, G., Joy, M. Munoz, F. (2011): Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. *Meat Science*, 87(1): 88-93.

Sante, V.S., Lacourt, A. (1994): The effect of dietary α-tocopherol supplementation and antioxidant spraying on colour stability and lipid oxidation of turkey meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(4):503-507.

Schaefer, A.L., Murray, A.C., Tong, A.K.W., Jones, S.D.M., Sather, A.P. (1993): The effect of antemortem electrolyte therapy on animal physiology and meat quality in pigs segregating at the halothane gene. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(2): 231-240.

Strydom, P.E., Frylinck, L., Montgomery, J.L. Smith, M.F. (2009): The comparison of three β-agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Science*, 81(3): 557-564.

Tipton, N.C., King, D.A., Paschal, J.C., Hale, D.S. and Savell, J.W. (2007): Effects of oral vitamin D3 suplemantation and suplement withdrawal on the accumulation of magnesium, calcium and vitamin D in the serum, liver, and muscle tissue and subsequent carcass and meat quality of *Bos indicus* influenced cattle. *Meat Science*, 75(1): 150-158.

Türkmen, İ.İ., Biricik, H., Deniz, G., Gezen, Ş., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ., Küçükersan, K., Küçükersan, S., Yalçın, S., Şehu, A., Saçaklı, P., Ergün, A., Yıldız, G. (2011): Temel Yem Bilgisi ve Hayvan Besleme. Anadolu Üniversitesi Web-ofset Tesisleri, Eskişehir.

Wang, W.J., Wang, S.P., Gong, Y.S., Wang, J.Q., Tan, Z.L. (2007): Effects of vitamin A supplementation on growth performance, carcass characteristics and meat quality in *Limosin×Luxi* crossbreed steers fed a wheat straw-based diet. *Meat Science*, 77(4): 450-458.

Wolfrom, G.W., Ivy, R.E., Baldwin, C.D. (1985): Effects of growth hormone alone and in combination with Ralgro (Zeranol) in lambs. *Journal of Animal Science*, 61(1): 249.

Yıldırım, M. (2011): Etlik piliç yemlerine farklı oranlarda ilave edilen konjuge linoleik asitin (KLA) piliç etindeki KLA miktarına ve et kalitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.

Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D.U. (2010): Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1): 15-31.

1(2): 103-108 (2015) doi: 10.3153/JFHS15010

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

REVIEW ARTICLE DERLEME MAKALESİ

MAKARNANIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

Ezgi ÖZGÖREN, Aydın YAPAR

Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli, Türkiye

Received: 17.02.2015

Accepted: 06.03.2015

Published online: 09.03.2015

Corresponding author:

Ezgi ÖZGÖREN, Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli, Türkiye

E-mail: ezgio@pau.edu.tr

Öz:

Zenginleştirme, gıdaların hazırlanması ve saklanması sırasında kayba uğrayan gıda bileşenlerinin yerine konması ve temel gıda maddelerinin yetersiz tüketiminden ileri gelen hastalıkların önlenmesi gibi amaçlarla gerçekleştirilmektedir. Unlu mamuller içerisinde ekmekten sonra en çok tüketilen gıda maddesi olan makarnanın her yaş grubundan bireyler tarafından sevilerek tüketilmesi nedeniyle zenginleştirilmesine yönelik yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Makarnanın besleyici değerini arttırmak için farklı kaynaklarla zenginleştirilmesi yoluna gidilmiştir. Bununla birlikte, çalışmalarda makarnanın tekstürel özellikleri, antioksidan özellikleri ve duyusal özellikleri de incelenmiştir. Bu çalışmada değişik amaçlarla makarnanın zenginleştirilmesine yönelik uygulamalar anlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

Makarna, Zenginleştirme, Fonksiyonellik

Abstract:

Approaches for Enrichment of Pasta

The aims of the food enrichment are substitution of the nutrients that were lost during processing and storage of the foods as well as prevention of diseases due to inadequate consumption of basic nutrients. Pasta is the most consumed food product after bread among bakeries. There are various enrichment studies for pasta because of it's widely consumption by every age. In order to increase the nutritional value of pasta, different sources has been used for enrichment. Therefore, textural, antioxidant and sensory properties of pasta were investigated. In this review, various applications of pasta enrichment were discussed.

Keywords:

Pasta, Enrichment, Functionality

Giriş

Yeterli ve dengeli beslenme; bireylerin büyüme ve gelişme potansiyellerine ulaşabilmesi, hastalıklardan korunması ve kaliteli bir hayat sürebilmeleri için temel bir gereksinimdir. Dengeli bir beslenme için yetişkin bir kişi, alması gereken günlük kalorinin % 55-60'ını karbonhidratlardan, %25-30'unu yağlardan (%5-6 omega-6 ve %0.6-1.2'sı omega-3 grubu yağ asitlerinden), %10-15'ini proteinlerden sağlamalıdır (Dursun ve diğ., 2009). Halk sağlığı sorunlarının pek çoğunun altında dengesiz ve yetersiz beslenme yatmaktadır. Bu sorunları çözmek için değişik bireysel ve toplumsal önlemler alınmaktadır. Alınan önlemlerden bazıları; anne sütü ile beslenme sıklığının arttırılması, beslenme eğitim programlarının yaygınlaştırılması, beslenme açısından riskli ve duyarlı olan gruplara yönelik özel eğitim programlarının yaygınlaştırılması ve toplumda görülme sıklığı yüksek olan beslenme sorunlarının çözümü için gıdaların zenginleştirilmesidir (Aslan ve Köksel, 2003).

Gıdaları zenginleştirmenin amaçları toplumda sıkça rastlanan vitamin ve mineral madde kayıplarını engellemek, gıdaların işlenmesi sırasında kaybolan gıda bileşenlerinin yerine konması, gıdada az miktarda mevcut olan gıda bileşenlerini takviye etmektir. Bu amaçların gerçekleştirilmesi iki şekilde yapılmaktadır. İlki ilave edilmesi veya zenginleştirilmesi düşünülen bileşenin zengin olduğu gıda maddesinin oluşturulacak gıdaya eklenmesi, ikincisi ise doğrudan eksik olan maddenin eklenmesidir (Kahraman, 2011**)**.

Yapılan çalışmalarda zenginleştirme ile gıdanın vitamin içeriğinin arttırılması, mineral madde içeriğinin arttırılması, protein içeriği ve çeşitliliğinin arttırılması, diyet lifi miktarının arttırılması, antioksidan kapasitesinin arttırılması ve yağ asitleri çeşitliliğinin arttırılması gibi gıda bileşenleri açısından zenginleştirmenin yanında gıdaya renk kazandırılması, tekstürel özelliklerinin iyileştirilmesi ile fonksiyonellik kazandırılması da sağlanmaktadır. Her yaş grubundan bireylerin severek tükettiği makarnanın zenginleştirilmesi ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Günümüzde makarna, besleyici, lezzetli, ucuz, hazırlanması kolay, raf ömrünün uzun olması gibi pek çok özelliği nedeniyle unlu mamuller içerisinde ekmekten sonra en çok tüketilen gıda maddesi haline gelmiştir (Anon.,2012).

Türk Gıda Kodeksi Makarna Tebliğine göre makarna; *Triticum durum* buğdayından üretilen irmiğe su katılıp tekniğine uygun yoğrularak hazırlanan hamurun şekillendirilip kurutulmasıyla elde edilen bir ürün olup; sade, tam buğday, çeşnili, zenginleştirilmiş ve güçlendirilmiş olarak adlandırılır. Çeşnili makarna; *Triticum durum* buğday irmiğinden tekniğine uygun olarak hazırlanan makarna hamuruna ve/veya kurutulmuş makarnaya et ve et ürünleri, yumurta, süt ve süt ürünleri, sebze, baklagil ve unları, *Triticum aestivum* ve *Triticum compactum* buğday ürünleri dışında diğer tahıl ürünleri ve lifleri, baharat ile tat vericiler ve benzerlerinin ilave edilmesi ile elde edilen bir üründür. Zenginleştirilmiş makarna; *Triticum durum* buğday irmiğinden tekniğine uygun olarak üretilen makarna hamuruna tiamin, riboflavin, niasin, folik asit, demir karışımı ve/veya D vitamini ve/veya kalsiyum ilave edilerek şekillendirilip, kurutulmasıyla elde edilen bir üründür. Güçlendirilmiş makarna ise zenginleştirilmiş makarna için belirlenen vitamin ve minerallerin üst sınır değerlerine protein katılarak hazırlanan hamurun şekillendirilip kurutulmasıyla elde edilen bir üründür (Anon., 2002).

Makarna uzun yıllardır taşıma, işleme, pişirme ve depolama kolaylığı nedeniyle yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Yetişkinlerin yanı sıra özellikle çocukların makarnayı severek tüketmeleri bu gıdanın zenginleştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Makarnanın zenginleştirilmesi ve fonksiyonelliğinin arttırılmasıyla ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar bitkisel kaynaklarla zenginleştirme, hayvansal kaynaklarla zenginleştirme ve doğrudan eksik olan bileşen ile zenginleştirme olarak üç grupta incelebilir.

Makarna Zenginleştirmede Uygulanan Yöntemler

Zenginleştirilmesi Düşünülen Bileşenin Zengin Olduğu Gıda Maddesinin Eklenmesi

Makarnaların zenginleştirilmesinde doğrudan gıdaların ilave edilmesi ile içeriklerinde yüksek miktarda bulunan gıda bileşenleri açısından zenginleştirme amaçlanmaktadır. Bu kapsamda zenginleştirme amacıyla ilave edilen gıdalar kaynaklarına göre bitkisel kaynaklar ve hayvansal kaynaklar olarak ikiye ayrılmaktadır.

Makarnanın Bitkisel Kaynaklarla Zenginleştirilmesi:

Makarna iyi bir protein kaynağı olmasına karşılık lisin ve treonin gibi bazı amino asitler açısından fakirdir. Makarnanın besleyici değerini arttırmak için farklı bitkisel kaynaklarla zenginleştirilmesi yoluna gidilmiştir (Petitot ve diğ., 2010). Baklagiller içerdikleri protein, lif, vitamin ve mineral maddeler nedeniyle iyi bir zenginleştirme kaynağı olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır.

Shogren ve diğ. (2006)'nin yaptıkları bir çalışmada makarna bileşimine %25, %35 ve %50 oranında soya fasulyesi unu ilave edilerek ucuz ve yüksek beslenme değerine sahip ürün eldesi amaçlanmıştır. Soya fasülyesi unu ilavesi ile ham protein miktarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada örnekler bazı amino asit miktarları açısından da incelenmiştir. Lisin amino asiti kontrol örneğinde 0.41 g/100 g olarak tespit edilirken %25, %35 ve %50 soya fasulyesi örneklerinde sırasıyla 1.07, 1.51, 1.75 g/100g'a yükseldiği belirlenmiştir. Ve ayrıca kontrol örneği ile %35'e kadar soya fasulyesi ilave edilmiş örneklerin tekstürel özellikleri ve lezzet özelliklerinde önemli bir fark tespit edilmemiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada meksika fasülyesi unu buğday irmiğiyle %15 ve %30 oranlarda karıştırılıp makarna üretimi gerçekleştirilmiştir. Meksika fasülyesi unu ilavesi ile pişme zamanında azalma, pişme kaybında artış, sertlikte ise azalma meydana gelmiştir. Meksika fasülyesi ilavesi ile renk değişimi arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Ayrıca toplam fenolik madde miktarı meksika fasülyesi ilavesi ile artış göstermiştir (Gallegos-Infante ve diğ., 2010).

Wood (2009)'un yaptığı çalışmada irmiğe % 10, 15, 20, 25, 30 oranlarında nohut unu ikame edilerek makarna üretimi gerçekleştirilmiştir. Protein miktarının kontrol örneğinde %12.4 iken, %30 oranında zenginleştirilmiş makarnada %17.4'e yükseldiği belirlenmiştir. Yine lisin amino asidi kontrol örneğine göre %15 ve %30 ikame edilen örneklerde sırasıyla %64 ve %182 oranında artış göstermiştir.

Guiberti ve diğ.(2015)'nin yaptıkları çalışmada pirinç ununa düşük fitik asitli ve lektin içermeyen bir tür fasulye unu ikamesi ile glutensiz makarna üretimi gerçekleştirilmiştir. Fasulye unu %20 ve %40 oranlarında formülasyona ilave edilmiştir. Zenginleştirme oranıyla paralel olarak diyet lifi ve protein miktarının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca optimum pişme süresinin ve su absorpsiyon kapasitesinin arttığı, buna karşın pişme kaybının ve tekstürel özelliklerin etkilenmediği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda baklagillerin glütensiz gıdaları zenginleştirmek için çok iyi bir kaynak olduğu belirtilmiştir.

Diğer bir zenginleştirme kaynağı olan diyet lifi, sindirim enzimlerine dirençli gıda bileşenleridir. İnce bağırsakta sindirilmeyen buna karşın kalın bağırsakta tamamen ya da kısmen fermente olan diyet lifleri suda çözünür ve suda çözünür olmayan diyet lifi olarak iki gruba ayrılmıştır. Çözünür diyet lifi kandaki kolesterolün düşürülmesi ve glukozun bağırsaktaki absorbsiyonun azaltılmasına yardımcı olurken, çözünür olmayan diyet lifi bağırsak sağlığı ile ilişkilidir (Dülger ve Şahan, 2011). Makarnaya fonksiyonellik kazandırma amacıyla yapılan bir çalışmada makarna ruşeym ve kepek ile zenginleştirilmiştir. Çalışmada makarna ruşeym ile %10-20-30-40-50-60 oranında zenginleştirilirken, kepek ile %10-20-30 oranında zenginleştirilmiştir. Ruşeym ve kepek ile zenginleştirme oranına paralel olarak diyet lifi miktarında artış meydana gelmiştir. %10 ruşeym ile zenginleştirilmiş makarna örneğinin kalite özellikleri minimum düzeyde etkilenirken bunların yüksek antioksidan kapasitesine ve yüksek diyet lifi miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Ruşeym miktarı %30'un üzerine çıktığında makarna örneklerinin arzu edilmeyen renk ve duyusal özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Kepek ile zenginleştirilen örneklerin renklerinin koyulaştığı belirlenmiştir. %10 kepek ilave edilen örneğin kontrol örneğiyle benzer duyusal özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Aravind ve diğ., 2012).

Yapılan diğer bir çalışmada buğday kepeği ilavesi ile yüksek lif içeriğine sahip makarna üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Makarna üretiminde irmiğe %20, 25, 30, 35, 40 oranlarında buğday kepeği ikame edilmiş ve bazı fiziksel, kimyasal, pişme özellikleri ve duyusal özellikleri incelenmiştir. Kepek ilavesi arttıkça protein, lipid, kül ve toplam diyet lifi miktarında artış, makarnanın renginde koyulaşma meydana gelmiştir. Optimum pişme süresi kontrol örneğinde 10 dakika, %40 kepek ilaveli örnekte 9.5 dakika olarak belirlenirken, diğer örneklerin optimum pişme sürelerinin kontrol örneğine göre daha uzun olduğu belirlenmiştir. Pişme kaybının %20, 25 ve 30 oranında zenginleştirilen örneklerde kontrol örneğinden daha az olduğu belirlenmiştir. Duyusal olarak tat, sertlik, yapışkanlık, çiğnenebilirlik ve esneklik açısından örnekler değerlendirilmiştir. Lif oranı artışı ile paralel olarak sertlikte, çiğnenebilirlikte ve yapışkanlıkta artış, esneklikte azalma, tatta ise bozulma meydana gelmiştir (Sobota ve diğ., 2015).

Antioksidan kapasitenin arttırılması amacıyla da çeşitli kaynaklarla makarna zenginleştirilmektedir. Soğanın yapısında bulunan flavanoidlerin antioksidan özellikleri sayesinde zenginleştirme için iyi bir kaynak olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada soğan tozu %5, %10 ve %15 oranlarında makarna üretiminde kullanılmıştır. Örnekler karşılaştırıldığında %10 soğan tozu ilaveli örneklerin kontrole en yakın duyusal özellikleri gösterdiği belirlenmiştir. Pişme kaybı kontrol örneğinde %2.6 olarak belirlenirken, %5, %10 ve %15 soğan tozu ilaveli örneklerde sırasıyla %5.42, %5.74, %8.16 olarak tespit edilmiştir. Gluten miktarının azalmasıyla pişme kaybının arttığı belirtilmiştir (Rajeswari ve diğ., 2013).

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar makarna bileşimine Hindistan kahverengi deniz yosunu (*Sargassum marginatum*) ilavesi yapıp kalite özelliklerini incelemişlerdir. Kurutulup (38±2°C) toz haline getirilen yosunlar %1, %2,5 ve %5 oranında buğday irmiğine ilave edilmiştir. Karışımlardan hazırlanan hamurlardan üretilen makarnalar 75°C'de 3 saat hava akımlı kurutucuda kurutulmuşlardır. Pişmiş ağırlığın en yüksek olduğu ve pişme kaybının en düşük olduğu makarna örneğinin %2.5 oranında *Sargassum marginatum* ilaveli örneğin olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneğinde toplam fenolik madde içeriği 0.09 mg GAE/g olarak tespit edilirken, %1 ve %2.5 oranında *Sargassum marginatum* ilaveli örneklerin 0.11 mg GAE/g, %5 *Sargassum marginatum* ilaveli örnekte ise 0.13 mg GAE/g toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. %2.5'dan daha fazla deniz yosunu ilave edilen örneklerde yosun tadı baskın karakter kazanmıştır. %2.5 deniz yosunu ilavesi ile üretilen örneğin biyoyararlılık ve kabul edilebilirlik açısından en iyi örnek olduğu tespit edilmiştir (Prabhasankar ve diğ., 2009).

Sant'Anna ve diğ. (2014)'nin yaptıkları çalışmada makarna üzüm posası tozu ile zenginleştirilmiştir. %2.5, %5 ve %7.5 oranında zenginleştirilen makarnalar pişme özellikleri, kimyasal özellikleri ve duyusal özellikleri bakımından incelenmiştir. %2.5 oranında zenginleştirilen örneğin kontrol örneğine ve diğer örneklere göre ağırlık artışının daha yüksek, pişme kaybının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarlarının zenginleştirilme miktarına paralel olarak arttığı saptanmıştır. Duyusal analizler sonucunda %2.5 oranında zenginleştirilen örneğin kontrol örneğiyle benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

Makarnanın Hayvansal Kaynaklarla Zenginleştirilmesi:

Beslenme uzmanları günlük alınması gereken proteinin üçte birinin hayvansal kaynaklı olmasını tavsiye etmektedir. Bunun için de kırmızı et, beyaz et, balık, süt ve yumurtanın düzenli şekilde tüketilmesi gerekmektedir (Dursun, 2006). Makarnanın zenginleştirilmesinde hayvansal kaynakların kullanımına ilişkin yapılan çalışmalarda çeşitli deniz ürünleri, et ürünleri, süt ve süt ürünleri gibi çeşitli kaynakların kullanımı üzerinde durulmuştur.

Yapılan bir çalışmada makarna formülasyonuna %10, %20 ve %30 oranında karides eti ilave edilmiştir. Tüm örnekler fizikokimyasal, pişme ve duyusal özellikleri bakımından incelenmiştir. Buğday irmiği ve karides eti ile hazırlanan hamur karışımları (100:0, 90:10, 80:20 ve 70:30) şekillendirilmiştir. 75 ^{0}C'de 3 saat hava akımlı kurutucuda kurutulmuştur. Karides eti ilavesiyle pişme zamanının arttığı, pişmiş ağırlığın azaldığı ve pişme kaybının arttığı belirlenmiştir. %20 karides eti ilavesine kadar örneklerin duyusal özellikleri çok etkilenmeden makarnanın besleyici değeri arttırılmıştır. Karides eti ilavesi ile makarnanın protein sindirilebilirliği ve yağ miktarında artış sağlanmıştır (Kadam ve Prabhasankar,2012).

Dhanasettakorn (2008)'un yaptığı bir çalışmada dondurularak kurutulan sığır kalbi makarna üretiminde %10 ve %30 oranında kullanılmıştır. Örneklerin Koenzim Q_{10} içeriği ve fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Sığır kalbi ilavesi ile nem miktarında azalma, ham yağ miktarında artış, kül miktarında artış, toplam karbonhidrat miktarında azalma, kolesterol miktarında artış ve ham protein miktarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Koenzim Q_{10} kontrol örneğinde tespit edilmezken, %10 ilaveli pişmiş örnekte 4.26 µg/g kuru ağırlık ve %30 ilaveli pişmiş örnekte 11.29 µg/g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir.

Baskaran ve diğ. (2011)'nin yaptıkları bir çalışmada araştırmacılar noodle (bir çeşit makarna) bileşimine peyniraltı suyu proteini konsantresi ve yağsız süt tozu ilave ederek besleyici değerini arttırmayı amaçlamışlardır. Örneklere %5, %7.5 ve %10 oranında peyniraltı suyu konsantresi, yağsız süt tozu ve bunların kombinasyonu (1:1) ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler hacim artışı, ağırlık artışı, şişme oranı ve pişme kaybı açısından incelenmiştir. Hacim artışı, ağırlık artışı ve şişme oranı kullanılan tüm maddelerin (yağsız süt tozu, peynir altı suyu proteini konsantresi ve ikisinin kombinasyonu) konsantrasyonlarının artmasıyla azalmıştır. Pişme kaybı ise madde konsantrasyonun artmasıyla artış göstermiştir.

Doğrudan Eksik Olan Maddenin Eklenmesi

Gıda zenginleştirilmesi ile yeme alışkanlıklarında bir değişim meydana getirilmeden ve zenginleştirilmemiş gıdaya göre %2'den az bir maliyetle üretim sağlanmaktadır (Dary ve Mora, 2002). Gıda zenginleştirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise doğrudan eksik olan maddenin gıda bileşimine ilave edilmesidir. Bu kapsamda özellikle vitamin ve mineral maddeler çeşitli gıdalara ilave edilirken makarnanın doğrudan protein ve diyet lifi ile zenginleştirilmesi üzerinde durulmuştur.

Protein içeriğinin arttırılması için yapılan bir çalışmada hardal protein izolatlarıyla (HPİ) %2.5, %5, %10 oranlarında zenginleştirilen makarnalar incelenmiştir. Kontrol örneğinde protein miktarı %11.5 ilen %10 oranında zenginleştirilen örnekte %20.6'ya çıkmıştır. Pişme özellikleri incelendiğinde pişmiş ağırlık kontrol örneğinde 31.4 g iken HPİ ilavesiyle azalarak %10 ilaveli örneklerde 26.5'e kadar düşmüştür. Pişme kaybı HPİ ilavesiyle azalmıştır. Yapışkanlıkta ise HPİ ilavesiyle azalma meydana gelmiştir. Sertlik değerleri kontrol örneğinde 77 gf iken %2.5, %5 ve %10 HPİ ilaveli örneklerde 90 gf' ye yükselmiştir. İn vitro protein sindirilebilirliği ise kontrol örneğinde %83 iken %10 HPİ ilaveli örneklerde % 88.6' ya yükselmiştir (Alireza Sadeghi ve Bhagya, 2008).

Sindirilemeyen frukto-oligosakkaritlerden olan inülin gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Brennan ve diğ. (2004)'nin yaptıkları bir çalışmada makarnaya %2.5, %5, %7.5 ve %10 oranında inülin ilave etmişlerdir. İnülin ilavesi arttıkça kuru madde miktarında artış, pişme kaybında artış, su absorbsiyonunda azalma, şişme indisinde azalma meydana gelmiştir. Tekstürel analiz sonucunda inülin ilavesiyle yapışkanlık ve esneklikte bir değişim meydana gelmezken sertlik değerinde azalma meydana gelmiştir. Örneklerin glisemik indeks değeri de incelenmiştir. İnülin ilavesiyle glisemik indeksin azaldığı gözlenirken, kontrol örneğiyle kıyaslandığında %2.5, %5, %7.5, %10 inülin ilavesiyle sırasıyla %2.3, %6.2, %7.4, %15 oranında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Nişasta tabiatında olmayan polisakkaritlerin nişasta degradasyonunu engellediği bu yüzden karbonhidratça zengin gıdaların sindirimi sırasında açığa çıkan şeker miktarını değiştirdiği belirtilmiştir.

Sonuç

Makarna her yaşta insan tarafından sevilerek tüketilen bir gıda maddesidir. Ekonomik olması ve uzun süre depolanabilmesi, bu çok sevilen gıda maddesine olan talebi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda makarnanın besleyici özelliğinin attırılması ve gıda bileşenleri bakımından zenginleştirilmesinin yanı sıra tekstürel ve duyusal özelliklerinin korunması da amaçlanmaktadır. Bu amacı gerçekleştirmek için farklı zenginleştirme kaynaklarının araştırılması gerekmektedir. Böylece hem ekonomik hem de yüksek besleyici değere sahip bir gıdanın üretimi sağlanabilecektir.

Kaynaklar

Alireza Sadeghi, M., Bhagya, S. (2008): Quality Characterization of Pasta Enriched with Mustard Protein Isolate. *Journal of Food Science,* 73(5): 229-237.

Anon. (2002): Türk Gıda Kodeksi Makarna Tebliği. Tebliğ No: 2002/20.

Anon. (2012):Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı. Makarna Sektör Raporları. Ankara

Aravind, N., Sissons, M., Egan, N., Fellows, C., (2012): Effect of insoluble dietary fibre addition on technological, sensory and structural properties of drum wheat spaghetti. *Food Chemistry,*130: 299-309.

Aslan, D., Köksel, H. (2003): Gıda Zenginleştirilmesi ve Bazı Yaklaşımlar. *Türk Tabipler Birliği Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi,*12(11): 418-420.

Baskaran, D., Muthupandian, K., Gnanalakshmi, K.S., Pugazenthi, T.R., Jothylingam, S., Ayyadurai, K. (2011): Physical properties of noodles enriched with whey protein concentrate (WPC) and skim milk powder (SMP). *Journal of Stored Products and Postharvest Research,* 2(6): 127-130.

Brennan, C.S., Kuri, V., Tudorica, C.M. (2004): Inulin-enriched pasta: effects on textural properties and starch degredation. *Food Chemistry,* 86: 189-193.

Dary, O., Mora, J.O. (2002): Food Fortification to Reduce Vitamin A Deficiency: International Vitamin A Consultative Group Recommendations.Proceedings of the XX International Vitamin A Consultative Group Meeting. 2927-2933

Dhanasettakorn, K. (2008): Coenzyme Q10 Content, Composition, Texture and Physiochemical Characteristics of Pasta Fortified with Freeze–Dried Beef Heart. University of Missouri–Columbia. Doktora Tezi

Dursun, S. (2006): Ekmek zenginleştirmede protein kaynağı olarak balık etinin kullanılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli.

Dursun, S., Yapar, A., Çelik, İ. (2009): Kadife balığı (Tinca tinca L.,1758) etiyle zenginleştirmenin hamurun reolojik özellikleri ve ekmeğin duyusal özellikleri üzerine etkisi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*,4(3): 44-58.

Dülger, D., Şahan, Y. (2011): Diyet lifinin özellikleri ve sağlık üzerindeki etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2): 147-157.

Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Ochoa-Martínez, L.A., Corzo, N., Bello-Perez, L.A., Medina-Torres ,L. , Peralta-Alvarez, L.E. (2010): Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (Phaseolus vulgaris L.). *Food Chemistry*, 119: 1544-1549.

Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Fortunati, P., Masoero, F. (2015): Cooking quality and starch digestibility of gluten free pasta using new bean flour. *Food Chemistry*, 175: 43-49.

Kadam, S.U., Prabhasankar, P. (2012): Evaluation of cooking, microstructure, texture and sensory quality characteristics of shrimp meat-base pasta. *Journal of Texture Studies*, 43: 268-274.

Kahraman, Ö. (2011): Süt ve Süt Ürünlerinin Çinko ile Zenginleştirilmesine İlişkin Yaklaşımlar. *GIDA*, 36(4): 241-248.

Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., Micard, V. (2010): Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43: 634-641.

Prabhasankar, P., Ganesan, P., Bhaskar, N. (2009): Influence of Indian Brown Seaweed (Sargassum marginatum) as an Ingredient on Quality, Biofunctional and Microstructure Characteristics of Pasta. *Food Science and Technology International*, 15(5): 471-479.

Rajeswari, G., Susanna, S., Prabhasankar, P., Venkateswara Rao, G. (2013): Influence of onion powder and its hydrocolloid blends on pasta dough, pasting, microstructure, cooking and sensory characteristics. *Food Bioscience*, 4: 13-20.

Sant'Anna, V., Christiano, F.D.P., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., Thys, R.C.S. (2014): The effect of the incorporation of grape marc powder in fettucini pasta properties. *LWT-Food Science and Technology*, 58: 497-501.

Shogren, R.L., Hareland, G.A., Wu, Y.V. (2006): Sensory Evaluation and Composition of Spaghetti Fortified with Soy Flour. *Journal of Food Science*, 71(6): 428-432.

Sobota, A., Rzedzicki, Z., Zarzycki, P., Kuzawinska, E. (2015): Application of common wheat bran for industrial production of high-fibre pasta. *International journal of Food Science and technology*, 50: 111-119.

Wood, J.A. (2009): Texture, Processing and organoleptic properties of chickpea-fortified spaghetti with insights to the underlying mechanisms of traditional durum pasta quality. *Journal of Cereal Science*, 49: 128-133.