

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KARİDESLERDE MELANOSİS (KARA BENEK)
OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ VE
4-HEXYLRESORCİNOL KALINTILARININ TESPİTİ**

FATİH SERT

**Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 504.07.01
Sunuş Tarihi: 13.07.2007**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şükran ÇAKLI

Bornova – İZMİR

2007

Ö Z E T**KARİDESLERDE MELANOSİS (KARA BENEK)
OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ VE
4-HEXYLRESORCİNOL KALINTILARININ TESPİTİ**

FATİH SERT

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim
Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Şükran ÇAKLI

Temmuz 2007, 53 sayfa

Bu çalışma, ekonomik öneme sahip karideslerdeki melanosis oluşumunu önlemede alternatif bir metot olan 4-Hexylresorcinol (4HR)'ün kullanımı ve üründeki kalıntı miktarlarının HPLC-FLD ile tespitine dairdir. Bu amaçla, Ege Denizi Özdere mevkiinden trol ile avlanan karidesler (*Parapenous longirostris*) kullanılmıştır.

Karidesler 5 gruba ayrılarak %0,0025 , %0,05 , %0,62 ve %0,1'lik 4HR solüsyonlarında 2 dk daldırarak uygulanmıştır. Bir grup örneğe ise kontrol amacıyla herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Uygulama sonrası derhal soğuk zincire alınan örnekler laboratuvar ortamına taşınmıştır.

Kalıntı analizleri için örnekler avlamayı takip eden 2., 4., 7. ve 14. günde çalışılmıştır. Bu süre zarfında örnekler buzdolabında (+2 - +4 °C aralığında) üzeri parça buzlarla kaplı olacak biçimde muhafaza edilmiştir.

Çalışma öncesi numuneler laboratuvar ortamına alınarak melanosis gelişiminin tespiti için görüntüleri kaydedilerek Otwell-Marshall melanosis gelişim skalasına göre değerlendirilmiştir. Skalaya göre tüm

örneklerin ilk 6 gün içinde kabul edilebilir değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

Kalıntılarının tespiti için Agilent HPLC-FLD kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürüne göre hazırlanan örnekler, belirlenen günlerde cihaza verilerek sonuçları kaydedilmiştir. Çalışma öncesi günlük kalibrasyon eğrisi, 25, 50, 75 ve 100 ppb'lik konsantrasyonlarla çizilmiştir. Her çalışma günü 2 yüklü (spike) ve 1 kör (blank) çalışılarak günlük ortalama geri alımlar belirlenmiştir. Günlük geri alımlar % 82- 112 aralığında değişim göstermiştir. 5 grup örneğin her biri için 3 paralelli çalışılarak ortalamaları kabul edilmiştir. Standart sapmalarda uç değerler çıkartılarak hesaba katılmamıştır. % 0,0025 konsantrasyonda 4HR uygulanmış A Grubu örneklerde ilk 6 günde melanosis skala değeri olarak 4'ü geçmemiştir.

4HR, karideslerde melanosisi önlemede düşük konsantrasyonlarda bile oldukça etkili olduğu gibi kalıntı miktarları yönünden %0,0025'lik konsantrasyonda 2 dk daldırma yöntemiyle uygulandığında ilk 4 gün içinde Avrupa Birliği MRL (Maksimum Rezidü Limitleri) değeri olan 2 mg/kg'ı aşmadığı tespit edilmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda uygulanması ve 4.günden sonraki değerlerde kalıntı miktarında yükselme olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Karides, melanosis, 4-Hexylresorcinol, kalıntı miktarları, HPLC-FLD

ABSTRACT

**MELANOSIS (BLACK SPOT) INHIBITION AND
4-HEXYLRESORCINOL RESIDUE ANALYSIS IN SHRIMPS**

FATİH SERT

M.Sc. Thesis, Department of Fishing and Processing Technology

Supervisor: Prof. Dr. Şükran ÇAKLI

July 2007, 53 pages

This study is about the use of the 4-Hexylresorcinol an alternative method for inhibiting melanosis on shrimps, with an economical value, and determining the residue amounts of those by HPLC-FLD. For this, shrimps caught with trawl from Ozdere location, at Aegean Sea.

Shrimps were divided into 5 groups and were applied with 4HR solutions at concentrations of 0,0025 – 0,05 – 0,62 – 0,1 % for 2 min. One of those wasn't applied any treatment due to the control analysis. The samples, taken to the cold-chain immediately after the application, were carried to the laboratory.

For residue analysis, samples were examined at the 2nd, 4th, 7th and 14th days after catching. At this time, the samples were put in safekeeping in refrigerator (between +2 - +4 C°) as covered with ice.

Before the examination, the samples were taken to the milieu and their images were setted down for the determination of the melanosis. They were evaluated according to the Otwell and Marshall's melanosis

VIII

scale. As to the scale, it was ascertained that the samples were in acceptable levels for the first 6 days.

For determining the residues, Agilent HPLC-FLD was used. The samples prepared to the extraction procedure were examined with equipment in definite days and the results were saved. Before the examinations, the daily calibration curves were fixed with 25, 50, 75 and 100 ppb standarts. Each exam days, 2 spiked samples and 1 blank sample were determined and daily recoveries were calculated. Daily recoveries shows variation between 82 and 112 %. For each five sample groups were examined with three parallels and their means are excepted. At standart deviations, the sharply points were removed and not added to the calculation. In the Group A samples applied 4HR with a concentration of 0,0025 %, the melanosis scale levels didn't pass over the number 4.

4HR is very effective in preventing melanosis even at a lower concentration also when applied in a concentration of 0,0025 % for 2 min by dipping was setted to pass over the level of 2 mg/Kg, the MRL of EC, for the first four days. But when it was applied at a higher concentration and after the 4th day, the residue limits were setted in an increase.

Key words: Shrimp, melanosis, 4-Hexylresorcinol, residue limits, HPLC-FLD

TEŐEKKÜRLER

Ülkemizde ve tüm dünyada yeni yeni çalışılmaya başlanan bir konu olan bu tezimde, bana yön veren ve çalışmalarımnda sürekli olarak destekleyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Şükran ÇAKLI'ya sonsuz teşekkürlerimle birlikte, laboratuvar ortamında her konuda tüm fedakârlığı ile destek veren kimyacımız sayın Güven ÖZDEMİR'e ve çalışma sürecinde araştırma ve çalışmalarımnda her an yanımda olan eşim Leyla SERT'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca tezin yazım ve hazırlanması aşamasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Bekir DOĞAN, Rıdvan UYSALER ve Ramazan ULUDAĞ'a, manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
KABUL VE ONAY SAYFASI	III
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
İÇİNDEKİLER	XI
TABLolar DİZİNİ	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Melanosis Üzerine Genel Bildirimler	4
2.1.1 Enzimatik esmerleşmeye genel bir bakış	4
2.1.2 Akuatik gıdalarda esmerleşmenin ekonomik yararları.....	4
2.1.3 Akuatik gıdalarda esmerleşmeden dolayı oluşan ekonomik kayıplar	5
2.1.4. Enzimatik esmerleşmenin fizyolojik rolü	6
2.1.4.1. Hayvanlarda	7
2.1.5. Esmerleşmenin kontrolü.....	8
2.1.5.1. İnhibitörler	10
2.5.1.2. İnhibitörlerin sınıflandırılması	10
2.2. 4-Hexylresorcinol Üzerine Genel Bildirimler	12
2.2.1. Kimyasal özellikler	12
2.2.2. Kimyasal açıklamalar	13
2.2.3. Genel açıklamalar	14

2.2.4. Biyokimyasal özellikler.....	14
2.2.4.1 Emilim, dağılım ve atılımı	14
2.2.4.2 Biyotransformasyon.....	14
2.2.4.3.Toksikolojik çalışmalar	14
2.2.5. MRL (Maksimum rezidü limitleri) değerleri	14
2.2.6. Enzim inhibitörü olarak 4-Hexylresorcinol.....	15
3. MATERYAL METOD	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Materyalin hazırlanması	19
3.1.2. 4-Hexylresorcinol uygulaması.....	19
3.2. Metod.....	21
3.2.1. HPLC Sistemi	21
3.2.2. Kalıntı Analiz Metodu	23
3.2.2.1. Reaktifler	24
3.2.2.2. Cihazlar	24
3.2.2.3. Ekstraksiyonun hazırlanması	24
3.2.2.4. Kromatografik koşullar.....	25
3.2.3. Melanosis değerlendirme	25
4.BULGULAR	27
4.1. Melanosis Gelişimi İçin Bulgular.....	27
4.2. Kalıntı Miktarları İçin Bulgular.....	33
5. TARTIŞMA	38
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42

KAYNAKLAR DİZİNİ	44
EKLER	48
ÖZGEÇMİŞ.....	53

TABLOLAR DİZİNİ

<u>TABLO</u>	<u>SAYFA</u>
Tablo 2.1. Enzimatik esmerleşmenin örnek inhibitörleri	11
Tablo 3.1. Konsantrasyonların hesaplanması	20
Tablo 3.2. Otwell ve Marshall melanosis gelişim skalası.....	26
Tablo 4.1. Melanosis gelişimi.....	27
Tablo 4.2. Örneklerin 2.gün kayıtları	28
Tablo 4.3. Örneklerin 4. gün kayıtları	29
Tablo 4.4. Örneklerin 7. gün kayıtları	30
Tablo 4.5. Örneklerin 13. gün kayıtları	31
Tablo 4.6. A Grubu örneklerde günlere bağlı melanosis gelişimi	32
Tablo 4.7. Tespit edilen kalıntı miktarları ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).....	33
Tablo 4.8. Geri alımlara bağlı olarak düzeltilmiş kalıntı miktarları ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).....	34
Tablo 4.9. Kalıntı miktarlarının ppm (mg/Kg) olarak değerleri	35
Tablo 4.10. Kalıntı miktarları.....	35
Tablo 4.11. A grubu kalıntı miktarları ve geri alımlar.....	36
Tablo 4.12. A Grubu kalıntı miktarı grafiksel değerlendirme....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 2.1. Bazı gıdalarda melanosis durumu.....	6
Şekil 2.2. Polifenol oksidaz enziminin mikroorganizmalarca aktivasyonu	7
Şekil 2.3. Hexylresorcinol, özellikle boğaz pastillerinde antiseptik olarak kullanılmaktadır	15
Şekil 2.4. 4-Hexylresorcinol'ün Polifenol oksidaz üzerindeki indirgeyici etkisi	16
Şekil 2.5. İşlenmemiş başları ayrılmış karideslerde 2°C de depolanma süresince siyah benek oluşumu	17
Şekil 3.1. Numune hazırlanmasında kullanılan ekipman	20
Şekil 3.2. Numunenin saklamada kullanılan ekipman	21
Şekil 3.3. HPLC ünitesi temel diyagramı	22
Şekil 3.4. Analizlerimizde kullanılan HPLC sistemi	23
Şekil 5.1. Kalıntı miktarlarındaki artış	39
Şekil 5.2. Enzimatik inhibitörlerin bir arada kullanımı.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- 4HR**..... : 4-Hexylresorcinol
- POE** : Polyphenol (Polifenol) Oksidaz Enzimi
- HPLC-FLD** .. :Yüksek Performanslı Likit Kromatografi – Floresans
Dedektör
- GRAS**..... : Genel Olarak Güvenlidir (Generally Recognised As
Safe)
- FDA** : Food and Drug Administration
- SCF** : Scientific Committee on Food of the EC
- FAO** : Dünya Gıda Örgütü
- Kg** : Kilogram
- mg** : Miligram
- µg** : Mikrogram
- nm** : Nanometre
- ppm** : Pieces Per Millions (mg/Kg)
- ppb** : Pieces Per Billions (µg/Kg)
- V**..... : Hacim
- BLK** : Blank (Kör) Numune
- SPK**..... : Spiked (Yüklü) Numune
- MRLs**..... : Maksimum Kalıntı Limitleri (Maximum Residue
Limits)
- ™**..... : Trade Mark

1.GİRİŞ

Su ürünleri sektöründe önemli ölçüde ekonomik değere sahip ürünlerin başında karidesler gelmektedir. Karidesler, yüksek değere sahip su ürünlerinin başında gelir, bu nedenle dünya su ürünleri sektöründe oldukça önemli bir ticari hacme sahiptir. Karidesler ekvatoran kutuplara kadar geniş bir yayılım alanına sahiptir. Tatlı su, acı su ve denizlerde yaygın olarak bulunur. 2500 türü bilinmektedir ve bunların sadece 300 kadarı ticari öneme sahip olup, özellikle 100 kadar türü dünya avcılığının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Başçınar, 2004). Türkiye denizlerinde bugüne kadar 61 tür saptanmış olup, bunlardan 7'si ticari olarak değerlendirilmektedir. Bu türlerden *Penaeus japonicus*, *Penaeus semisulcatus*, *Metapenaeus monoceros*, *Metapenaeus stebbingi* ve *Trachypenaeus curvirostris* Kızıl Deniz kökenli olup, Akdeniz ve Ege sahillerinde; *Penaeus kerathurus* ve *Parapenaeus longirostris* ise Karadeniz dışındaki tüm denizlerde yaygın olarak bulunur. Karadeniz'de ticari değere sahip türlere rastlanılmamaktadır, çünkü ekolojik koşullar karidesler için fazla uygun değildir (Anonim, 2004) .

Raf ömrünün uzatılması, tüketici istek ve beklentileri, doku ve tat değişimleri işleme sektöründe üzerinde durulması gereken önemli konulardır. Karides işleme sektöründe ise siyah benek oluşumunun (melanosis) önlenmesi oldukça önemli bir konudur. Siyah benek oluşumu tüketicinin talebinin düşmesine, dokuda değişimlere ve raf ömrünün kısa olmasına sebep olmaktadır (Taoukis et al., 1990). Siyah benek oluşumu yani melanosis ölümden birkaç saat sonra oluşan ve ürünün niteliğinin bozulmasına neden olan bir seri reaksiyonlar sonucunda meydana gelmektedir (Taoukis et al., 1990.; Mendes et al., 2005).

Melanosis meyve,sebze ve crusteçalarda oluşabilir (Marshall et al., 2000). Kabuklu deniz ürünlerinde hasat sonrası soğutma hemen uygulanmazsa kabuktaki değişimler derhal başlar ve bu durum raf ömrünü kısaltır. Görünümdeki bu değişimler tüketici sağlığı açısından risk taşımamakla birlikte ürünün tercih edilmemesine ve ürünün bozulmuş olduğu düşüncesine neden olmaktadır. Bu durum sektörde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Melanosis oluşumu türlere, avlama sonrası işlemlere ve çevresel şartlara bağlı olarak farklılık gösterir. Melanosis karideslerde baş kısmında, bacak diplerinde, karapaks ve kuyrukta yayılma göstermektedir (Mendes, 2005) .

Melanosis inhibisyonu yani önlenmesi ticari kayıplar nedeniyle önem kazanmaktadır. Melanosis inhibitörleri antioksidanlar, asitleyiciler, şelatlayıcı ajanlar, enzim inhibitörleri ve kompleksleyici ajanlardır (Marshall et al., 2000). Yaygın olarak antioksidanlardan sülfidler kullanılmaktadır (Montero et al., 2005.; Mendes, 2005). Ancak özellikle üst solunum yolları rahatsızlıkları taşıyan insanlarda sağlık yönünden riskler taşıması nedeniyle alternatif yöntemlerin aranılması gereği doğmuştur (Wagner and Finne, 1986). Bu maksatla son zamanlarda alternatif bir ajan olarak 4-Hexylresorcinol (4HR) değerlendirilmiştir.

4HR, karideslerde melanosis inhibisyonunda son zamanlarda bahsi geçen ve uygulanmaya başlanmış bir antiseptik maddedir (Anonim, 2003). 4HR'nin daldırma yöntemiyle uygulanması, melanosisi önlemede oldukça başarılı olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Otwell et al., 1992.; McEvily et al., 1990). 4HR, melanosis reaksiyonunda rol oynayan Polifenol Oksidaz Enzimi (POE) ile etkileşerek bu reaksiyonu katalize etmesini engeller (McEvily et al., 1992). 4HR, bu konuda oldukça spesifik ve etkilidir (McEvily et al., 1991,1992). POE, 4HR tarafından bağlandığı ve etki etmesini önlediği için melanosis oluşumunda duraklama olduğu gözlenmiştir (Mendes, 2005). Sülfite alternatif olarak 4HR kullanımı, sağlık açısından da oldukça güvenlidir. Terapötik (tedavi) amaçlarla uzun yıllardır boğaz pastillerinde kullanılıyor olması sülfidlere göre oldukça zararsız olduğunu açıkça göstermektedir. Kullanımda çok düşük konsantrasyonlarda bile etkin olduğu tespit edilmiştir (Frankos et al., 1991).

Kullanılan her bir harici madde üründe kalıntı bıraktığı gibi 4HR için de kalıntı değerleri Avrupa Birliği Kriterleri'nce belirlenmiştir (EC Directive 2006/52). Kalıntı miktarlarının tespiti için Yüksek Performanslı Likit Kromatografi-Fluoresans Dedektör (HPLC-FLD) ile yapılmaktadır (Jonker and Dekker, 2000). AB Direktifleri uyarınca 4HR, gıda katkı maddeleri arasında yer almaktadır ve kalıntı değerleri olarak, taze veya işlenmiş kabuklu ve su ürünlerinde 2 mg/kg'lık bir limit belirtilmiştir (Anonim, 2003).

Karideslerdeki melanosis oluşumu ve önlenmesi, bu konuda kullanılan kimyasal ajanlar ve kalıntılarına dair yapılan çalışmalar şöyledir:

Robbins (1931), hexylresorcinol ve heptilresorcinolün farklı şartlar altında emilim ve atılımının miktarsal çalışmalarını araştırmıştır.

Otwell and Marshall (1986), karideslerde melanosis kontrolü için sülfidit kullanımı üzerine çalışmış ve sülfiditlere alternatif ajanların araştırılmasını yapmışlardır.

Frankos et al. (1991), karideslerde melanosisi önlemek için 4HR'nin kullanımı ve toksikolojik ve farmakolojik değerlendirilmesini çalışmışlardır.

Radha et al. (1991), karideslerde siyah benek oluşumunun önlenmesi, 4-Hexylresorcinol ve kalıntı analizlerini çalışmışlardır.

Slattey et al. (1995), siyah benek önlemede iri karideslerin uzun süreli 4HR içine daldırma işlemlerini incelemiştir.

Jonker and Dekker (2000), HPLC-FLD ile 4HR kalıntılarını çalışmışlardır.

Mendes et al. (2005), *P.longirostris*'de işleme sürecinde 4HR kalıntılarındaki değişimleri incelemiştir.

Montero et al. (2005), melanosis inhibisyonu ve *P.longirostris*' de çeşitli uygulamalar sonucunda 4HR kalıntı seviyelerini incelemiştir.

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez karideslere avlama sonrası hemen 4HR daldırma uygulaması yapılarak 4HR'nin melanosis önlemedeki etkileri gözlemlenmiş ve kalıntı analizleri yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Melanosis Üzerine Genel Bildirimler

2.1.1. Enzimatik esmerleşmeye genel bir bakış

Görünüm, tat, doku ve besleyici değer gıda seçiminde tüketicilerce göz önünde bulundurulmuş dört özelliktir. Renk tarafından önemli derecede etkilenen görünüm, gıda kalitesini değerlendirmede tüketicilerce kullanılan ilk özelliklerden bir tanesidir. Renk klorofil, karotenoid ve gıdalardaki antosianinler gibi doğal olarak bulunan pigmentlerce veya hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu oluşan pigmentlerce etkilenmiş olabilirler. Enzimatik esmerleşme meyve, sebze ve su ürünlerini etkileyen en önemli renk reaksiyonlarından biridir. Başlangıçta fenoloksidaz, fenolaz, monofenoloksidaz, difenoloksidaz ve tirozinaz olarak bilinen polifenoloksidaz enziminin bu olay katalize edilir (Marshall et al., 2000).

Enzimatik esmerleşme meyve sebze ve su ürünlerinde en çok incelenen reaksiyonlardan biridir. Gıda bilimi, bahçivanlık, ekim ve hasat sonrası fizyoloji, mikrobiyoloji ve hatta böcek ve kabuklu fizyolojisi ile ilgilenen araştırmacılar bu sistemlerdeki etkilerinin farklılığından dolayı bu reaksiyonu incelemiştirler (Lambrecht, 1995.; Marshall et al., 2000).

2.1.2 Akuatik gıdalarda esmerleşmenin ekonomik yararları

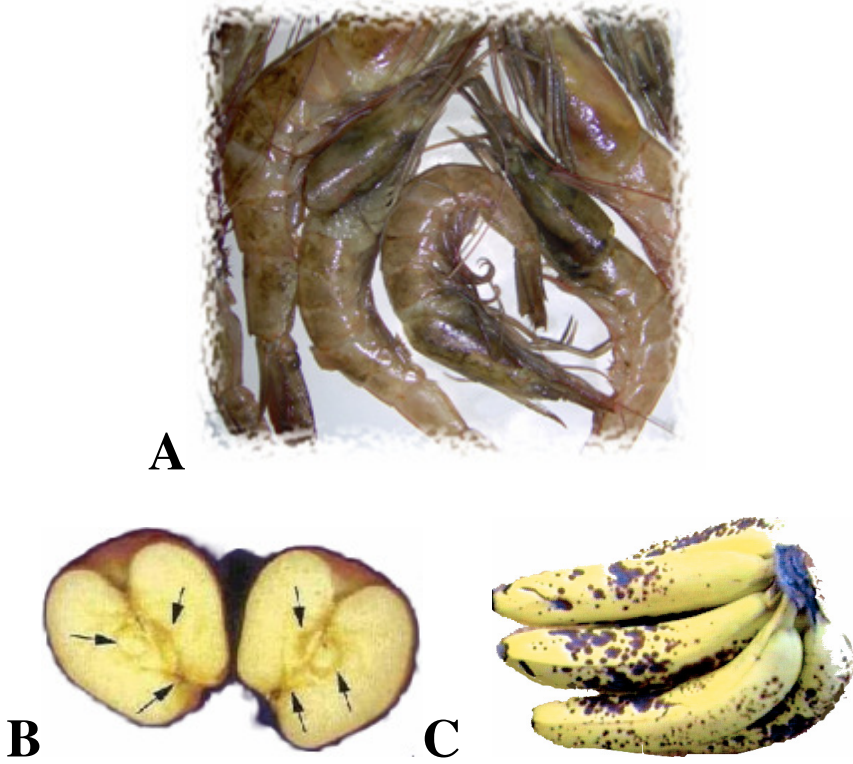
Akuatik organizmalar gelişimleri ile ilgili önemli fizyolojik fonksiyonları bildirmek için polifenoloksidaza güvenmektedir. Polifenoloksidazlar karides ve ıstakoz gibi kabuklularda ve böceklerde kabuk değiştirme sonrası kabuğun sertleşmesinde önemlidir (Marshall et al., 2000). Polifenoloksidaz yaraların iyileştirilmesinden de sorumludur. Akuatik organizmalardaki yaraların iyileştirilmesi, hem anti bakteriyel hem de antifungal aktiviteler sergileyen kinononların polimerizasyonu sonucunda üretilmiş bileşikleri içeren bitkilerde oluşanlarla aynıdır. Maalesef hasat sonrası kabukların polifenoloksidazca esmerleşmesinin katalize etmesi hem kalite hem de bu ürünlerin tüketicilerce kabul edilebilirliğini zıt olarak etkilemektedir.

2.1.3 Akuatik gıdalarda esmerleşmeden dolayı oluşan ekonomik kayıplar

Hasat sonrası akuatik gıdalardaki esmerleşme veya melanosis kabuklularda birincil olarak meydana gelmektedir. Bu yüksek fiyatlı ve ekonomik olarak değerli ürünler enzimatik esmerleşmeye son derece açıktır. Melanosis hasat sonrası depolama süresince kafalar ayıklanmadığı takdirde ıstakozlarda genellikle daha şiddetlidir. Eğer kafa uzaklaştırılırsa latent haldeki polifenoloksidazı aktive eden ve esmerleşmeyi yükselten proteazları elemine etme açısından gerekli ihtimam gösterilerek kuyruğun tamamen yıkanması gerekir. Melanosisli ürünlerin zararlı olmamasına ve tat veya aromayı bozmamasına rağmen tüketiciler bu ürünlerdeki bozulmayı çağrıştıran esmer renk değişiminden dolayı bu ürünleri seçmeyecektir. Bu ürünlerdeki şiddetli melanosis marketlerde yer alan bu akuatik ürünlerce yüksek değer arz etmesinden dolayı muazzam ekonomik kayıplara sebep olabilir. Önemli derecede azaltılan veya melanosisin şiddetinden dolayı tamamıyla kaybedilen milyonlarca dolar değere sahip ABD' ya giren ithal edilmiş pek çok akuatik ürün örnekleri bulunmaktadır (Marshall et al., 2000). Maalesef bu ürünlerin büyük bir çoğunluğu bilimsel ve teknik kaynaklarca fakir ve bu yıkıcı kayıpların oluşmasını önlemek için gerekli işleme alt yapısınca fakir olan gelişmekteki ülkelerden elde edilmektedir. Diğer taraftan melanosis için kabul edilebilir kabuklu türlerinin sınırlı olması melanosisi önlemek için ürünlerin nasıl işleneceğine karar verilmesi probleminde yol açmaktadır.

Yukarıda tartışmanın temelinde esmerleşmenin hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olmasına dayandığı açıktır. Esmerleşmenin zararlı etkilerinin kontrolü bu yüzden gıdacılara önemli bir sorun yaratmaktadır.

Meyve ve sebzelerdeki esmerleşmenin kontrolü meyve sebze ve su ürünlerinde esmerleşmeyle sorumlu mekanizmanın anlaşılmasına, polifenoloksidaz enziminin özelliklerine onları substrat ve inhibitörlerine ve bu parametrelerin her birisini etkileyen kimyasal, biyolojik ve fiziksel faktörlerin anlaşılmasına bağlıdır. Bu mekanizmaların anlaşılmasıyla gerek esmerleşmenin önlenmesinde gerekse şiddetinin yavaşlatılmasında uygulanabilir. Böylece ürünlerin raf ömrü uzatılabilir (Martinez and Whitaker, 1995).



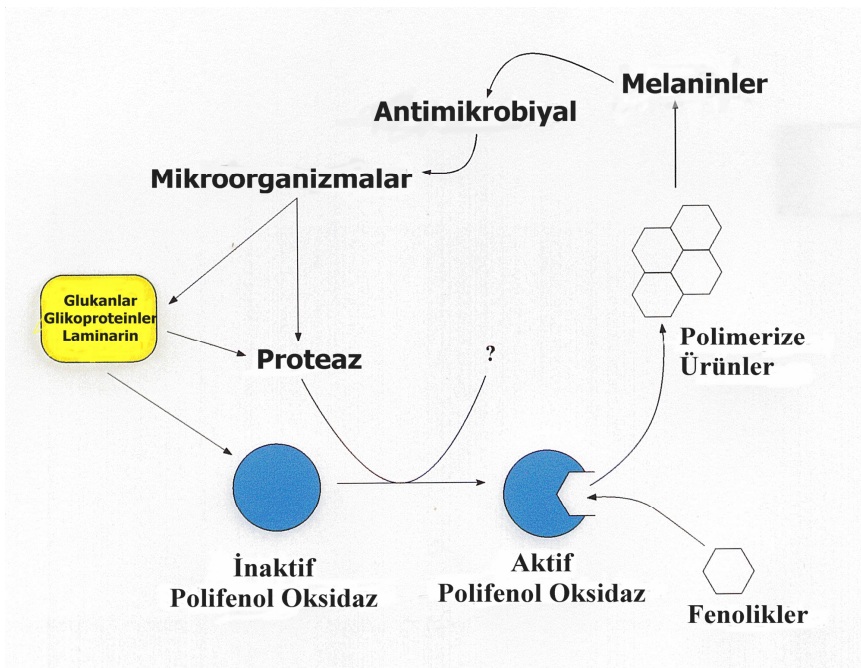
Şekil 2.1. Bazı gıdalarda melanosis durumu (**A.**Karides, **B.**Elma , **C.**Muz)
(Lambrecht., 1995; Marshall et al.'dan, 2000)

2.1.4. Enzimatik esmerleşmenin fizyolojik rolü

Gıdacıların enzimatik esmerleşmenin nasıl önleneceğini daha iyi anlayabilmeleri için polifenoloksidazın bitki ve hayvan dokusunda neden bulunduğu anlaşılması önemlidir. Bu dokulardaki POE'nin bazı fonksiyonlarının bilinmesine ve tahmin edilmesine karşın, bilim adamları gerek bitkilerde gerekse hayvanlarda bu enzimin fonksiyonlarından oluşan bulmacanın parçalarını bir araya getirmeye hala uğraşmaktadırlar (Marshall et al., 2000; Martinez and Whitaker, 1995).

2.1.4.1. Hayvanlarda

POE gerek böceklerde gerekse kabuklularda zimojen veya propolifenoloksidaz formunda bulunur ve bu canlılarda hastalıklara karşı direnç sağladığı düşünülmektedir. Bu enzimin aynı zamanda hem bağışıklıkla hem de ayırt edicilikle ilgili olduğuna inanılmaktadır. Araştırmacılar karides ve ıstakozlarda latent POE'nin hem tripsin hem de endojen enzimlerce aktive edildiğini göstermektedirler (Chen and Challa, 1992). Bu araştırmacılar bu türlerdeki aktivasyonun bir kısım izoenzimlerce oluşturulan proteoliz sonucu oluştuğunu bildirmektedirler. Şimotripsin ve pepsin gibi tripsin kadar aktivasyonda etkili değildir (Ferrer et al.,1989).



Şekil 2.2. Polifenol oksidaz enziminin mikroorganizmalarca aktivasyonu (Lambrecht et al, 1995; Marshall'dan, 2000)

Şekil 2.2, konakçı savunma mekanizması proPOE'nin aktivasyonunu resmetmektedir. POE'i aktive eden proteazlar mikrobiyal aktivitelerce eyleme geçirildiği düşünülür. Glukanz, glikoproteinler, laminarinler, lipopolisakaritler gibi mikroorganizmalarca üretilen

ikincil metabolitler de propolifenolinoksidazın proteazlarca aktivasyonunu başlatır. Bu metabolitler aynı zaman da proteolitik aktivitelerin yokluğunda bile proPOE'nin aktivasyonunda yeteneklidir. Hayvanlarda savunma mekanizmasının POE aktivitelerini benimsemesine rağmen kabuklu ve böceklerdeki asıl rolü büyük ölçüde yaşam döngüsü süresince kitin kabuğunun sertleşmesine ilişkindir. Kabuğun sertleşmesinin böcek ve kabukluların kabuk değiştirmesiyle ilişkili olması sebebiyle proPOE'nin aktivasyonu kabuk değiştirme aşamaların kontrolü için mükemmel bir mekanizma sunar. POE'nin böceklerde geniş ölçüde çalışılmasına rağmen hem kabuklularda hem de böceklerde kabuk değiştirme işlemi hemen hemen aynı şekilde gerçekleştiği açıktır. ProPOE kabuk değiştirme döngüsünün başından sonuna kadar bulunur (Marshall et al., 2000).

2.1.5. Esmerleşmenin kontrolü

Enzimatik esmerleşmenin oranı dokunun aktif POE konsantrasyonu, fenolik konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve oksijenin mevcudiyetine bağlıdır. POE fenollerin oksidasyonunu katalize ederek oldukça aktif bileşikler olan kinononlara dönüştürür. Kinononlar kendiliğinden polimerizasyona uğrayarak yüksek molekül ağırlıklı bileşikler veya esmer pigmentleri (melaninleri) üretir. Bu melaninler aminoasit ve proteinlerle reaksiyona girerek esmer rengin artmasına yol açabilir (Marshall et al., 2000). Pek çok çalışma gıdalarda POE'nin gerek inhibisyonu odaklanmıştır. Bu istenilmeyen enzim aktivitelerinin kontrolü için yıllarca çeşitli teknik ve yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler bir veya daha fazla reaksiyonda gerekli bileşiklerin yok edilmesini amaçlamıştır.

- ✓ **Oksijenin önlenmesi:** Oksijenle temasın kesilmesi büyük ölçüde esmerleşmeyi geciktirir. Ancak esmerleşme oksijene maruz kalınca hızla gerçekleşir. Oksijenin uzaklaştırılması suya, sosa, salamuraya daldırmayla veya vakum uygulamasıyla mümkündür.
- ✓ **Prostetik bakır gruplarının uzaklaştırılması:** Enzimatik esmerleşmenin oluşabilmesi için POE'nin bu bakır grubuna sahip olması gerekir. Şelatin ajanlar bu bakır yapının uzaklaştırılmasında etkilidir (Chen and Challa, 1992).

- ✓ **POE'nin inaktivasyonu:** Konservelenmiş veya dondurulmuş gıdalarda esmerleşmenin kontrolü için buharda haşlamak gibi ısı işlemler POE'nin inaktivasyonunda etkilidir. Ancak ısı işlemler uygulanabilirlik açısından taze ürünlerde uygun değildir (Montero et al., 2001).
- ✓ **Fenolik substratlarının kimyasal modifikasyonu:** POE kafeik asit, protokatekik asit, klorojenik asit ve trozin gibi fenolik substratların oksidasyonunu katalize eder. Bu substratların kimyasal modifikasyonu oksidasyonunu önleyebilir (Sanchez-Ferrer et al., 1989; Taoukis et al., 1990).
- ✓ **Özel kimyasal bileşikler:** Belirli kimyasal bileşikler POE aktivitelerinin ürünleri ile reaksiyona girer ve melanin oluşumuna yol açan enzimatik olmayan reaksiyon aşamalarında oluşan renkli bileşiklerin oluşumunu inhibe eder.

Enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde birçok teknik uygulanır. Parçalayıcı enzimlerin kullanımı, doğal olarak oluşan enzim inhibitörleri, radyasyon uygulanması gibi oldukça yeni teknikler ısı işleme ve kimyasal işlemlerle ilişkili sağlık risklerine alternatif olarak araştırılmakta ve kullanılmaktadır (Mendes, 2005).

Esmerleşmenin kontrolü için belli başlı bazı işlemler şu başlıklar altında toplanabilir:

Isıl işlem
 Dondurma
 Dehidrasyon
 Radyasyon işlemleri
 Yüksek basınç uygulaması
 Süper kritik karbondioksit uygulaması
 Ultrafiltrasyon
 Ultrasonikasyon
 ve ayrıntılı olarak ele alınacak olan; inhibitörler.

2.1.5.1. İnhibitörler

Enzimatik esmerleşme enzimleri, substratları veya reaksiyonun diğer ürünleri hedeflenerek inhibe edilebilir.

- i. *Enzimler hedeflenerek inhibisyon*: Polifenol enzimi üzerine direkt rol oynayan inhibitörler iki grupta toplanabilir. İlk grup, azide, cyanide karbon monoksit, tuz iyonları ve tropolone gibi metal iyon şelatörleri içerir ve çeşitli kaynaklardan polifenol üzerine iyi derecede etkir. İkinci grup; benzoik asit ve cinnamik asitin aromatik karboksilik asitlerini içerir ve fenolik bileşiklere yapısının benzerliği ile polifenol oksidaz enzimi ile rekabet ederek etkir.
- ii. *Substratları hedefleyerek inhibisyon*: Ortamdaki hem oksijenli hem de fenolik substratların uzaklaştırılması ile esmerleşme kontrol edilebilir. Oksijenin uzaklaştırılması kuşkusuz fenolik oksidasyonun önlenmesinde kullanılan son derece memnun edici bir işlemdir. Bununla birlikte oksijenin aşırı derecede azlığı, anaerobik metabolizmanın eyleme geçmesini ve bunun sonucunda tat kaybı ve bozuklukları gibi bazı metabolizma sapmalarına yol açar. Bazı spesifik absorbanlar gıdalardaki fenolik bileşikleri elemine etmesi için fiziksel olarak uygulanabilir. Cyclodextrinler, polifenol içeren bileşikleri oluşturarak polifenol oksidaz enzimini inhibe ettiği düşünülür. Bunun yanı sıra, sülfatlı polisakkaridler de esmerleşmede inhibitör etkiye sahiptir.
- iii. *Reaksiyon ürünlerini hedefleyerek inhibisyon* (McEvily et al., 1992)

2.1.5.2. İnhibitörlerin sınıflandırılması

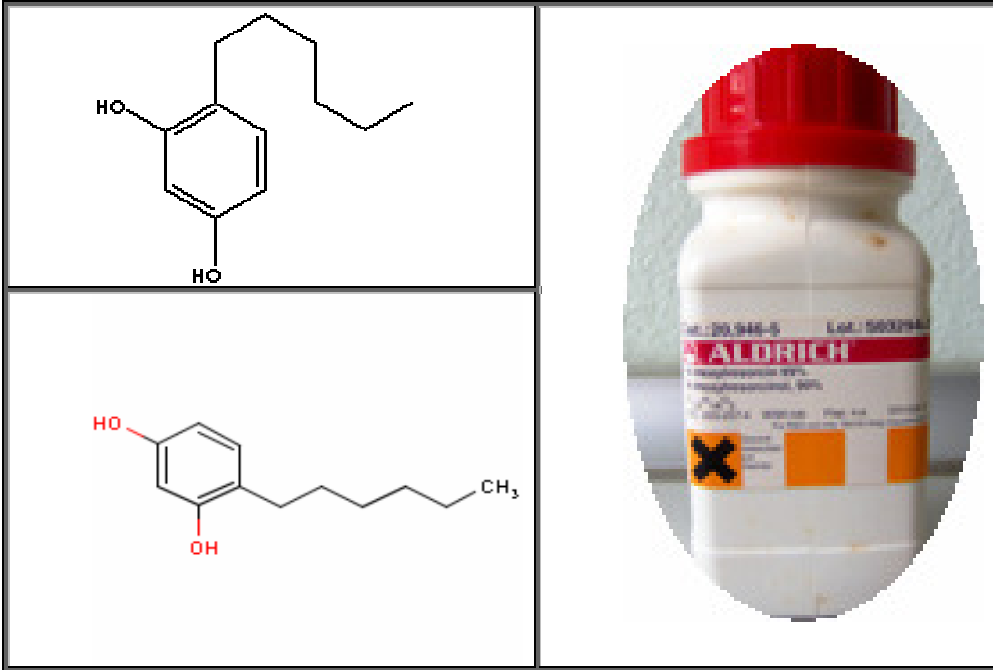
Gıda işlemede esmerleşme inhibitörlerinin kullanımı, toksisite, sağlık, tat, doku üzerindeki etki ve maliyetlere ilişkin faktörlerce sınırlandırılmıştır. Esmerleşme inhibitörleri birincil etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. POE inhibitörlerinin 6 kategorisi enzimatik esmerleşme önlenmesinde uygulanabilmektedir. Bunlar:

Tablo 2.1. Enzimatik esmerleşmenin örnek inhibitörleri (McEvily et al., 1992)

İndirgeyici ajanlar	Sülfatlı ajanlar Askorbik asit ve analogları Sistin Glutathione
Şelatin ajanlar	Fosfatlar EDTA Organik asitler
Asitli bileşikler	Sitrik asit Fosforik asit
Enzim inhibitörleri	Aromatik karboksilik asitler Alifatik alkoller Anyonlar Peptidler Resorsinol bileşikleri
Enzim uygulamaları	Oksijenazlar o-metil transferazlar Proteazlar
Kompleksleştirici ajanlar	Cyclodextrinler

2.2. 4-Hexylresorcinol Üzerine Genel Bildirimler

2.2.1. Kimyasal özellikler



Formülü: C₁₂H₁₈O₂

Molekül Ağırlığı: 194.27 gr

Sinonim: 4-Hexyl-1,3-dihydroxybenzene; 4-Hexyl-1,3-benzenediol; 4-Hexylresorcinol; 4-n-hexylresorcinol; Ascaryl; crystoids anthelmintic; Gelovermin; Caprokol; Hexylresorcinol; 4-Hexylresorcin (Almanca); 4-hexilresorcinol (İspanyolca); 4-hexylrésorcinol (Fransızca); 4-hexylresorcine

Fiziksel durumu: Beyazdan kirli beyaza kadar kristalize

Erime noktası: 65 – 67 °C

Kaynama Noktası: 333 °C

Su İçinde Çözünürlük: < 0.1 g/100ml (alkol ve eterde çözülebilme)

2.2.2. Kimyasal açıklamalar

Dihydroxybenzene molekül yapısının geleneksel isimlere sahip 3 izomeri bulunmaktadır. *Ortho (1,2) izomer*; çözeltilerde fotoğrafik güçlendirici olarak kullanılan berrak kristal formunda ve nöron iletilici ve hormonal olarak önemli fizyolojik etkilere sahip sentetik catecholaminlerin üretiminde başlatıcı rol oynayan; *Catechol* olarak da adlandırılır. *Meta (1,3) izomer*; diazo boyar maddelerin üretiminde kullanılan iğne kristalleri ve plastikleştiricileri oluşturan *Resorsinol*'dür. Benzenin sülfürik asidi buharı ile sülfonlaştırılması ile ve kostik soda ile benzenedisülfonik asidin erimesi neticesinde elde edilir. Resorsinol reçinelerde UV absorbanı olarak kullanılır. Floresans üretiminde, deri boyamada ve yapıştırıcılarda kullanılır. Formaldehit ile reaksiyonuyla yapay ipek ve naylon yapımında kullanılan reçineyi üretir. Sülfür gibi diğer akne tedavileriyle kombine olarak yağlı cilt problemlerinde ve akne tedavisinde kullanılır. Güneş yağlarında ve şampuanlarda kepek önleyici olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca sentetik farmakolojik kimyasallarda ve diğer organik bileşiklerde ara fonksiyona sahiptir. *Para (1,4) izomer*; fotoğrafik güçlendirici ve üretici olarak kullanılan berrak prizmalar oluşturan Hidrokinonon (kinolon olarak da bilinir) olarak adlandırılır. Benzokinononun çok miktardaki kimyasal reaksiyonlarında oluşur. Bu bileşik genel amaçlı inhibitör, stabilizer, antioksidant ve ara üründür. En önemli kullanımı diğer inhibitör antioksidant, stabilizer, boya ve zirai kimyasalların yapımında ara ürün olmasıdır.

4-Hexylresorcinol; suda çözünmez, alkol ve eterde çözülebilir, gargaralarda ve deri yaralarının temizlenmesinde antihelmentik ve antiseptik olarak ve gıdalarda esmerleşme önleyici olarak kullanılır. (<http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/4-hexylresorcinol.htm>)

2.2.3. Genel açıklamalar

Bu madde karides ve diğer kabuklularda melanosiz (siyah benek) gelişimin önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Avrupa Birliği 'nce daha önceleri bu maksat dışında değerlendirilmemiştir.

4-hexylresorcinol, yenilebilir kabuklu porsiyonunda yaklaşık 1 mg/kg'lık bir kalıntı ile sonuçlanan 50 mg/litre konsantrasyonda sıvı solüsyon olarak uygulanmaktadır. Bu kullanımdan kaynaklanan bileşiğin vücuda alımı yaklaşık olarak günlük kişi bazında 1-8 µg'dır. Bu sonuca

karşın, Avrupa Birliği 4-hexylresorcinolü düşük miktarlarda tüketilen maddeler için daha önceleri yayınlanmış ilkelere göre değerlendirmiştir. Komite, antiseptik olarak kullanılan, her pastilde 2,4-4 mg 4-hexylresorcinol içeren boğaz pastillerinin bazı ülkelerde miktarın çok çok üstünde kullanıldığını bildirmektedir.

(<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je04.htm>)

2.2.4. Biyokimyasal özellikler

2.2.4.1 Emilim, dağılım ve atılımı

İki kişi 4-hexylresorcinolden 1 gr aldıklarında, ilk 12 saat içinde idrarda ortalama %18 geri alınmıştır, sonrasında bileşiğe idrarda rastlanmamıştır. Fekal atılım ise dozun %64'ü kadardır.(Robbins,1931)

2.2.4.2 Biyotransformasyon

4-hexylresorcinolün bir eterik sülfat bileşiği formunda temel olarak idrar yoluyla atıldığı bildirilmiştir (Goodman and Gilman, 1970; Marshall et al.'dan, 2000). Ancak bu bilginin doğruluğu araştırılmamıştır.

2.2.4.3.Toksikolojik çalışmalar

4-hexylresorcinol alkol içinde veya zeytinyağı içersinde kedilere verildiğinde 60 mg/kg a kadar bir dozajda patolojik etkileri olmadığı gözlenmiştir. Ancak 260 mg/kg'lık bir doz tüm hayvanlar için ölümcül olmuştur. 88-140 mg/kg aralığındaki dozajda köpeklerde bir etki gözlenmemiştir (Christensen and Lynch, 1993; Marshall et al.'dan, 2000).

2.2.5. MRL (Maksimum rezidü limitleri) değerleri

Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin, 95/2/EC Renklendirici ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkıları Direktifi ve 94/35/EC Gıda Maddelerinde Tatlandırıcıların Kullanımı Direktifi'ni düzenleyen 5 Temmuz 2006 tarihli 2006/52/EC Direktifi gereğince; etken madde olarak 4- Hexylresorcinol, E586 gıda katkı maddesi kodu ile taze,

dondurulmuş veya derin dondurulmuş kabuklu et dokusunda maksimum kalıntı limitini (MRLs) 2 mg/kg olarak belirlemiştir.

'E 586	4-Hexylresorcinol	Fresh, frozen and deep-frozen crustaceans	2 mg/kg as residues in crustacean meat';
--------	-------------------	---	--

2.2.6. Enzim inhibitörü olarak 4-Hexylresorcinol

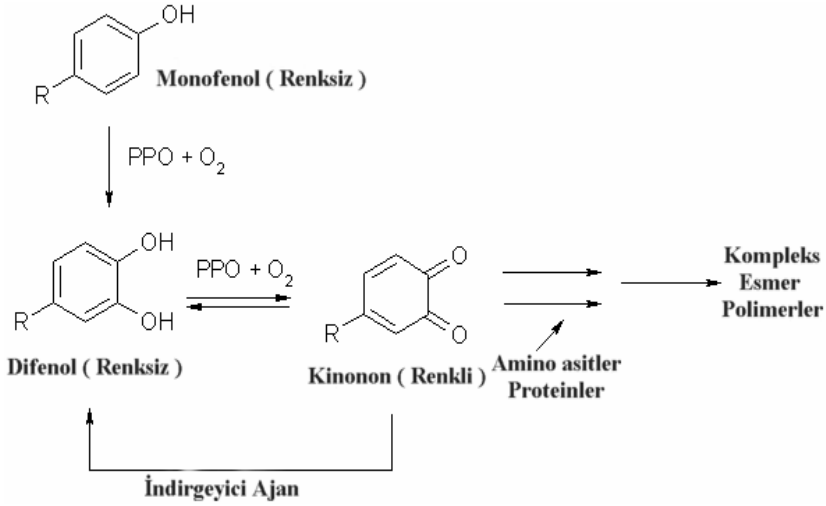
Fenolik parçalara yapısal olarak benzeyen m-difenolik bileşikler olan değiştirilmiş resorsinoller polifenol oksidaz aktivitesi üzerinde tam bir önleyici etkiye sahiptir (McEvily et al., 1991,1992). 4. aromatik resorsinol halkasına hekzil, dodesil veya siklohekzil grupları hidrofobik olarak bağlanırsa polifenol oksidaz üzerindeki etki artmaktadır. Tirosinin hem monofenolaz hem de difenolaz aktiviteleri 4HR ile inhibe edilmektedir (Frankos et al., 1991). 4-hexylresorcinol farmasötik kullanımda uzun bir geçmişe sahiptir ve melanosis inhibitörü olarak güvenle ve etkin olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.3. 4-Hexylresorcinol, özellikle boğaz pastillerinde antiseptik olarak kullanılmaktadır.

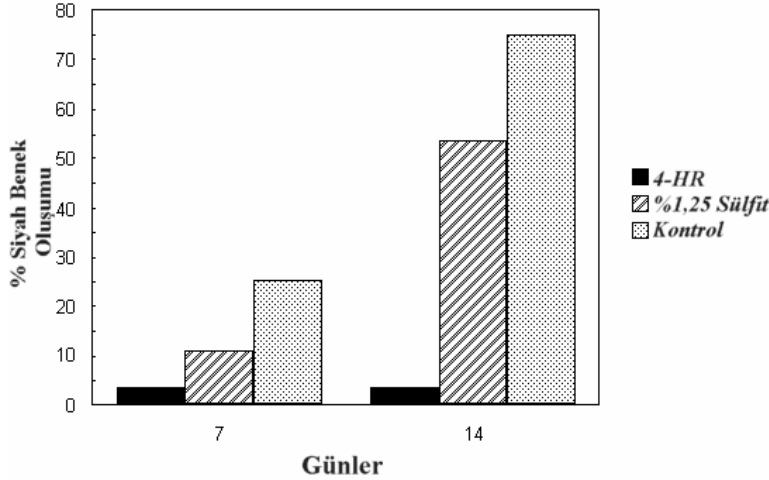
4HR gıdalarda esmerleşmenin kontrolünde sülfitle göre bir kısım avantajlara sahiptir. Bunlar, inhibitör etkisinde spesifik etkisi, düşük konsantrasyonda etkili olması ve kimyasal dayanıklılığıdır. Esmerleşmenin önlenmesinde askorbik asit ile birlikte sinerjik etkiye sahiptir. 4HR polifenol oksidaza özel olarak etkirken askorbik asit polifenol oksidaz tarafından oluşan kinononları indirger ve enzimatik

reaksiyonu katalize edemez hale getirir (Kahn and Andrawis, 1985; Marshall et al.'dan, 2000).



Şekil 2.4. 4-Hexylresorcinolün Polifenol oksidaz üzerindeki indirgeyici etkisi (Kahn and Andrewis, 1985; Marshall et al.'dan, 2000)

Birçok çalışma 4HR'nin karideslerde enzimatik esmerleşmenin kontrolünde etkinliğini göstermiştir (Otwell et al, 1992; McEvily et al, 1991). EverFreshTM, aktif bileşen olarak 4HR ve taşıyıcı ajan olarak sodyum klorid içeren patentli bir üründür (ABD patent no: 5,049,438). Sülfite alternatif olarak kabuklularda enzimatik esmerleşme yani siyah benek oluşumunun kontrolü için incelenmiştir (Lambrecht, 1995). Taze kafaları ayrılmış karidesler 1 dk süreyle 4HR içine daldırıldıklarında, temiz suya veya %1,25 sodyum metabisülfite daldırılmış olanlara göre daha uzun bir periyotta siyah benek oluşumunda ciddi bir dayanıklılık sergilemiştir. 2 °C de 7 günlük bir depolama sonrasında bu karides örneklerinde temiz su uygulanmış olanlarda %54 oranında, sodyum metabisülfite uygulananlarda % 11 ve 4HR uygulanan örneklerde ise sadece %3,6 oranında siyah benek oluşumu gözlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. İşlenmemiş başları ayrılmış karideslerde 2°C de depolanma süresince siyah benek oluşumu (Lambrecht, 1995; Marshall et al.'dan, 2000)

14. gün sonrası kontrol numunesinde ve sülfite uygulanmış örneklerde sırasıyla % 75 ve %25 oranında siyah benek oluşmuştur. Ancak 4HR uygulanmış karideslerde ise siyah beneklerde bir artış gözlenmemiştir.

4-hexylresorcinol kimyasal olarak dayanıklı suda çözülebilen bir bileşiktir. Toksikolojik, mutajenik, karsinojenik ve alerjik incelemeler ve çalışmalar karides uygulamalarında 4HR kullanım seviyelerine ilişkin herhangi bir risk olmadığını göstermektedir (Frankos et al, 1991). 4HR, karidesler için kullanımında Amerika Birleşik devletleri Gıda ve İlaç Yönetimi (US Food and Drug Administration) tarafından GRAS (Generally Recognised As Safe, genel olarak güvenlidir) olarak kabul edilmiştir (Frankos et al., 1991;). Karideslerde melanosis önlemede kullanımı 1 ppm'e kadar olan kalıntı limitlerinde tat, doku veya renkte herhangi bir etkiye sahip değildir (Iyengar et al, 1991).

Enzimatik esmerleşmenin kontrolünde yeni yaklaşımlar üniversitelerde, devlet araştırma laboratuvarlarında ve ticari sektörde çalışma altındadır. Bu alternatif yöntemler, etkinlik, maliyet ve düzenleyici etkilerine göre değerlendirilmelidir. Enzimatik inhibitörler tat, doku ve rengi etkilememelidir. Belirli bir esmerleşme önleyici ajanının seçimi uygulanacak metodun yanı sıra bu faktörlere de dayanmaktadır.

Enzimatik esmerleşmenin kontrolünde pek çok metot uygulanabilir. Fiziksel uygulamalara ilave olarak, kimyasalların büyük bir kısmı polifenol oksidazı inhibe edebilmektedir. Ancak sınırlı sayıdaki enzimatik esmerleşme inhibitörleri tüketici sağlığı ve/veya maliyetler sebebiyle kabul edilerek uygulanabilmektedir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada Penaeidae familyası karideslerden *P. longirostris* türü kullanılmıştır. Ortalama 10 cm boyunda 4,5 kg karides ile örneği çalışılmıştır.

3.1.1. Materyalin hazırlanması



Bu çalışmada kullanılacak karideslerin avlanması amacıyla İzmir-Seferihisar koyundan 5 kişilik mürettebata sahip küçük bir trolle denize çıkıldı. Av sahası; Teke Burnu ile Özdere arasında $38^{\circ} 06' 682''$ N enlemi ile $26^{\circ} 41' 158''$ E boylamları arasındaki bölgedir. Derinlik olarak 120 ile 140 kulaç (1 kulaç =1,83 m) arasında çekim yapılmıştır. Çekim 2 knott (mil/sa)'lık bir hızla saat $06.^{30}$ ile $13.^{30}$ arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. 4-Hexylresorcinol uygulaması

Çalışma grupları olarak, avlanan karidesler gruplara ayrılarak daha önceden tespit edilen yükleme miktarlarına karşılık gelecek şekilde tekne üzerinde 2 dk'lık daldırma yöntemiyle 4HR ile muamele edildi. Çalışma öncesi 4 seviye tespit edildi. Her bir grup için 750 gr kabuklu karides örneği esas alındı. Karides / deniz suyu oranı $\frac{1}{2}$ olacak şekilde her bir grup için 1,5 L deniz suyu hazırlandı. Hesaplanan konsantrasyonlara karşılık gelecek şekilde 4HR deniz suyu içerisinde çözdürüldü.

Tablo 3.1. Konsantrasyonların hesaplanması

Grup A (%0.0025)	0,0379 gr 4HR 1500 ml deniz suyu içinde çözdürüldü.
Grup B (%0.05)	0,7565 gr 4HR 1500 ml deniz suyu içinde çözdürüldü.
Grup C (%0.62)	9,3012 gr 4HR 1500 ml deniz suyu içinde çözdürüldü.
Grup D (%0.1)	1,5616 gr 4HR 1500 ml deniz suyu içinde çözdürüldü.

**Şekil 3.1 - 1****Şekil 3.1 - 2****Şekil 3.1.** Numune hazırlanmasında kullanılan ekipman

Avlanan karidesler deniz suyu ile yıkama sonrası tartılarak (Şekil 3.1-1) her bir grup kendi daldırma solüsyonları içinde 2 dk bekletildi. İşlem tamamlanınca karides örnekleri numaralandırılmış saklama kapları (Şekil 3.1-2 ve Şekil 3-2) içersine alınarak ½ karides/ buz olacak şekilde kırılmış buzla kaplanarak soğuk hava deposunda karaya çıkıncaya kadar tutuldu.

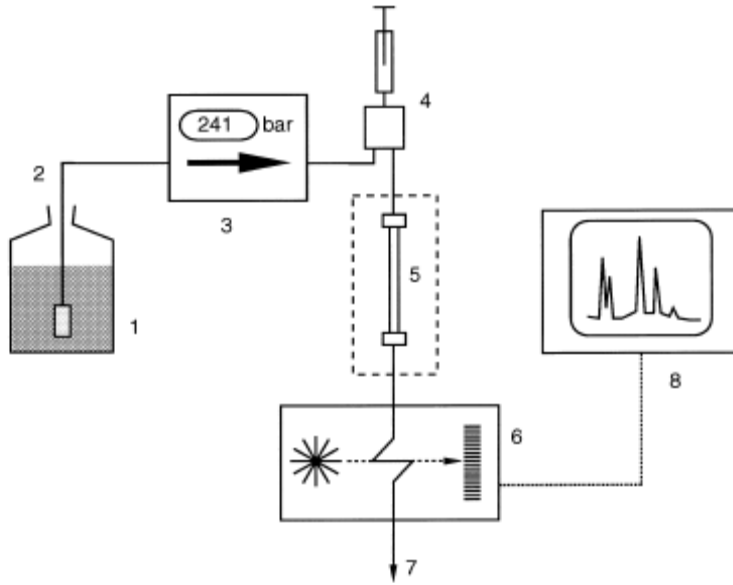


Şekil 3.2. Numunenin saklamada kullanılan ekipman

3.2. Metod

3.2.1. HPLC Sistemi

Bir HPLC sistemi bireysel modüller halinde veya tek bir aparat olarak kurulabilir. Modüller bir sistem bir sorun halinde daha esnek bir yapıya sahiptir. Parça değişimi modüller sistemde mümkün olduğu gibi tek bir firmaya bağlı kalma zorunluluğu da ortadan kalkmış olacaktır. Eğer kendi başınıza bazı küçük problemleri çözmek gibi bir düşünce sahibi değilseniz bu durumda kompakt sistemleri tercih etmelisiniz. Kompakt sistemler ise daha fazla modülden oluştuğu için çok daha fazla yer kaplayacaktır.



Şekil 3.3. HPLC ünitesi temel diyagramı 1-Solvent Şişesi 2-Fritli transfer hattı 3-Pompa 4- Enjektör 5-Kolon (Termostatlı) 6-dedektör 7-Atık 8-Veri Değerlendirme (Meyer, 2004)

Bir HPLC sistemi şekilde gösterildiği gibi en azından Mobil faz ünitesi, transfer hattı, pompa, kolon, dedektör ve verileri kaydedip değerlendirme birimlerine sahip olmalıdır. En önemli parça kolon olmasına rağmen genellikle en küçük parçadır. Isı kontrolü için termostata yakın yerleştirilir. Birden fazla solvent (çözücü) ile çalışma yaygın olduğu için pompa biriminde kontrollü bir mikser gerekmektedir. Değerlendirme bir bilgisayar ile yapılıyorsa aynı zamanda tüm sistemin kontrolü de bu bilgisayar ile yapılabilmektedir.



Şekil 3.4. Analizlerimizde kullanılan HPLC sistemi

HPLC'nin doğası gereği 3 sağlık riski bulunmaktadır:

Toksik solventler

Sabit fazdan kaynaklanan pulmoner iritasyon

Yüksek basınçtan ileri gelen tehlike

Solventlere ve bunların buharlarına uzun ve kısa vadede maruz kalmanın riskleri herkesçe bilinse de genellikle gerekli itina gösterilmemektedir. Kaplar amaçlarına uygun biçimde kapaklarla kapatıldığında ve kimyasal atıklar yeterli genişlikteki kaplarda ve itina ile uzaklaştırıldığında laboratuvar içi toksik buhar, çevresel kirlilik olmayacak ve yüksek saflıktaki solventlere bulaşmamış olacaktır.

3.2.2. Kalıntı Analiz Metodu

4HR kalıntı miktarlarını tespit için Jonker and Dekker (2000) 'e ait metod kullanılmıştır. Metod; ürünlerin metanol ile ekstraksiyonu ve ters faz kolon ile floresans dedektörde tespitine dayanmaktadır. % 75 ortalama geri alım ile 25, 50, 75, 100 ppb'lik standartlarla değerlendirme yapılmıştır.

Avlamayı takip eden 2, 4, 7 ve 14 günlerde her bir grup örnekten 3 paralel çalışılmıştır. Örneklerle ilave olarak 3 blank (kör) örnek ve 3 spike (yükü) örnek günlük geri alım ve kontrol için çalışılmıştır. Çalışma sonunda toplamda 72 örnek sonuçları değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. Reaktifler

• **4-Hexylresorcinol H-6250 (Sigma Chemical CO.): Stok solüsyonu;** 10 ml'lik hacimli balon içine 50 mg 4-HR tartılarak metanol ile çözdürülerek hacme tamamlanır. **Stok standardı** ise; stok solüsyonundan 200 µ alınarak 10 ml MeOH ile dilue edilir. **LC stok solüsyonu:** 250 µ stok standardından alınarak 10 ml MeOH ile hazırlanır. **LC çalışma standartları:** 25, 50 ve 75 ng/ml olacak şekilde LC stok solüsyonundan alınarak mobil faz ile hazırlanır.

• **Fosfat Buffer (pH 3.0):** 0,01 M'lik olarak hazırlanır. 1,36 gr KH_2PO_4 1 L su içerisinde çözdürülerek pH % 25'lik H_3PO_4 ile ayarlanır.

• **Ultra saf su**

• **Mobil faz:** Fosfat buffer : Acetonitril (40+60, v/v)

3.2.2.2. Cihazlar:

- **LC Sistem:** Agilent 1100 Series, Floresans dedektör ve ChemStation Software
- **LC analiz kolonu:** Ters-faz C_{18} 250 x 4 mm (Inerstil ODS_2)
- **Degasser:** Agilent D1100

3.2.2.3. Ekstraksiyonun hazırlanması

Numuneler:

- Karidesler ayıklanır ve homojenize edilir.
- 5 gr homojenize doku 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine 10 ml su ilave edilir.
- 30 sn karıştırılır.
- 15 ml metanol ilave edilip 30 sn ultrasonikte tutulur.
- 5 dk. 3000 g'de santrifüj edilir.
- Üst faz 50 ml'lik hacimli balona filtre edilerek alınır.

- 10 ml ilave edilerek ekstraksiyon iki kez daha tekrarlanarak üst fazlar balonda filtre edilerek toplanır. Hacim su ile 50 ml'e tamamlanır.
- Balon karıştırılır.
- 5 ml alınarak 20 ml'lik hacimli balonda mobil faz ile hacme tamamlanır.
- 1 ml eppendorf tüpüne alınarak 3 dk 11000 g'de santrifüj edilir.
- Üst fazın 50 μ 'sı cihaza enjekte edilir.

Yüklü Numuneler:

5 gr homojenize karides numunesine 100 μ 4HR stok standardından ilave edilip 15 dk beklenir ve ekstraksiyon prosedürü aynen uygulanır.

3.2.2.4. Kromatografik koşullar

Akış hızı: 0,8 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 50 μ

Dedektör: Ex: 280 nm

Em: 310 nm


Çalışma süresi: 15 dk

Başlama ve bitişlerde LC çalışma standartlarından 50 ng/ml'lik standart ve yüklü numuneler ile çalışılmıştır.

3.2.3. Melanosis Değerlendirme

Örneklerdeki melanosis gelişiminin değerlendirilmesinde Otwell ve Marshall'a ait melanosis skalası esas alınmıştır.

Tablo 3.2. Otwell ve Marshall melanosis gelişim skalası

Melanosis Durumu	Açıklama	Melanosis gelişim skalası (Otwell ve Marshall, 1986)
0-1	Melanosis yok	
2-3	Bazı karideslerde az melanosis	
4-5	Çoğu karideste az melanosis	
6-7	Çoğu karideste, orta derecede melanosis	
8-9	Çoğu karideste, yüksek derecede melanosis	
10	Ağır derecede, kabul edilemez	

4.BULGULAR

4.1. Melanosis Gelişimi İçin Bulgular

Karaya çıkartılan örnekler en kısa sürede laboratuara ulaştırılarak buzdolabında ortalama 2,8 ° C de tutuldular. İki haftalık bir süreçte burada bekletilen örnekler, günlük yapılan melanosis değerlendirilmesi esnasında, gerekli olduğu düşünüldüğünde, kirli suları uzaklaştırılarak yerine kırılmış buz ilavesi yapılarak soğuk muhafazası son derece dikkatle takip edilmiştir. Bu süre zarfında kaydedilen melanosis gelişimi şöyle gerçekleşmiştir:

Tablo 4.1. Melanosis gelişimi

GÜNLER	GRUPLAR				
	A (%0,0025)	B (%0,05)	C (%0,62)	D (%0,1)	BLK
1.GÜN	1	1	1	1	1
2.GÜN	1	1	1	1	2
3.GÜN	1	1	1	1	3
4.GÜN	2	1	1	1	5
5.GÜN	2	2	1	1	5
6.GÜN	3	2	1	1	7
7.GÜN	4	2	2	1	8
8.GÜN	4	2	2	2	9
9.GÜN	5	3	2	2	10
10.GÜN	6	3	2	2	10
11.GÜN	6	3	2	2	10
12.GÜN	6	3	2	2	10
13.GÜN	7	4	2	3	10
14.GÜN	8	4	2	3	10

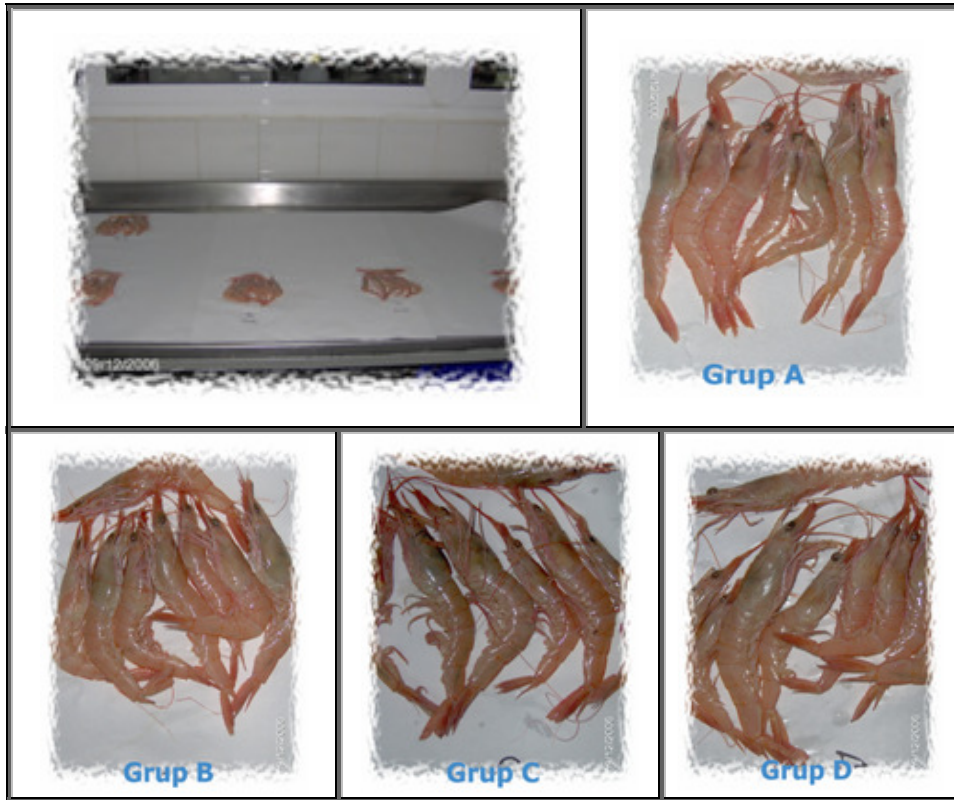
Tablo dikkate alındığında, kör örneklerde 4. günden sonra melanosis gelişimi kabul edilebilir düzeyi aşmaya başlamıştır. 7. günden

sonra yüksek derecelere ulaşmıştır. 4HR uygulanmış örneklerde ise ilk 6 gün içinde melanosis gelişimi oldukça düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak melanosis gelişimi değişmiştir. Yüksek konsantrasyon uygulanmış örneklerde (Grup C ve Grup D) 2 haftaya yakın bir sürede melanosis gelişmemiştir. Tüketim süresinde (ilk 4 gün) 4HR melanosisi engellemede başarılı olmuştur.

Örneklerdeki melanosis durumu, Otwell ve Marshall'ın skalasına göre değerlendirilerek karideslerin durumları dijital ortamda kaydedilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce örnekler buzdolabından çalışma masasına çıkartılmış ve görüntüleri alınmıştır. Günlere bağlı olarak alınan grupların fotoğrafları şöyledir:

2. Gün:

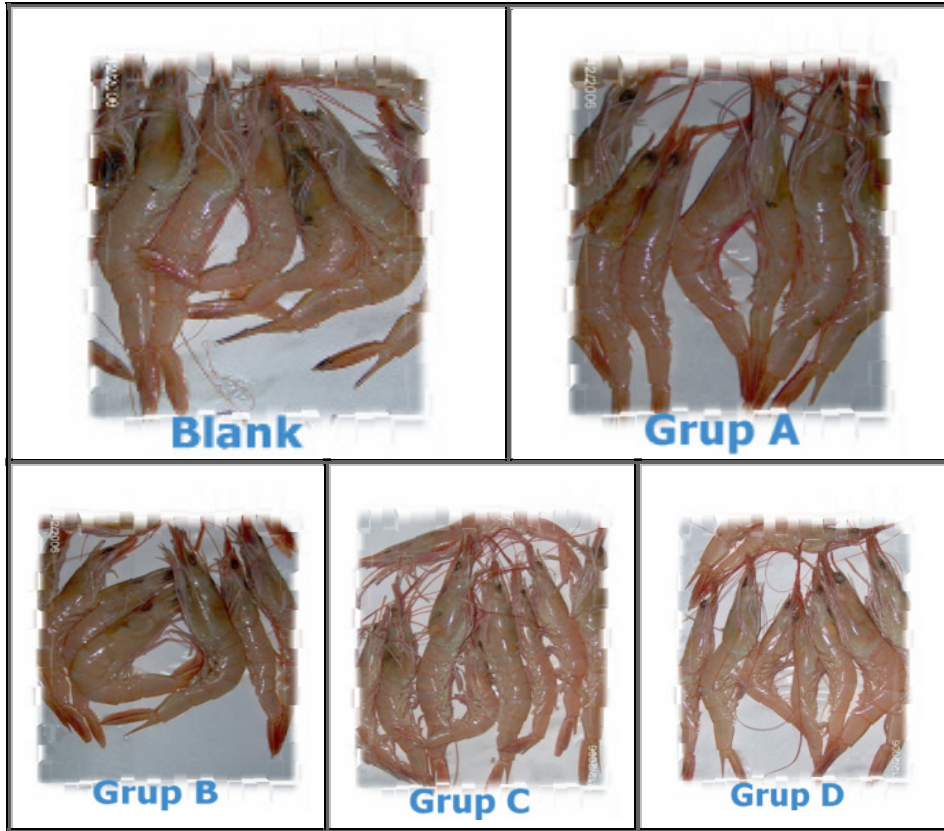
Tablo 4. 2. Örneklerin 2.gün kayıtları



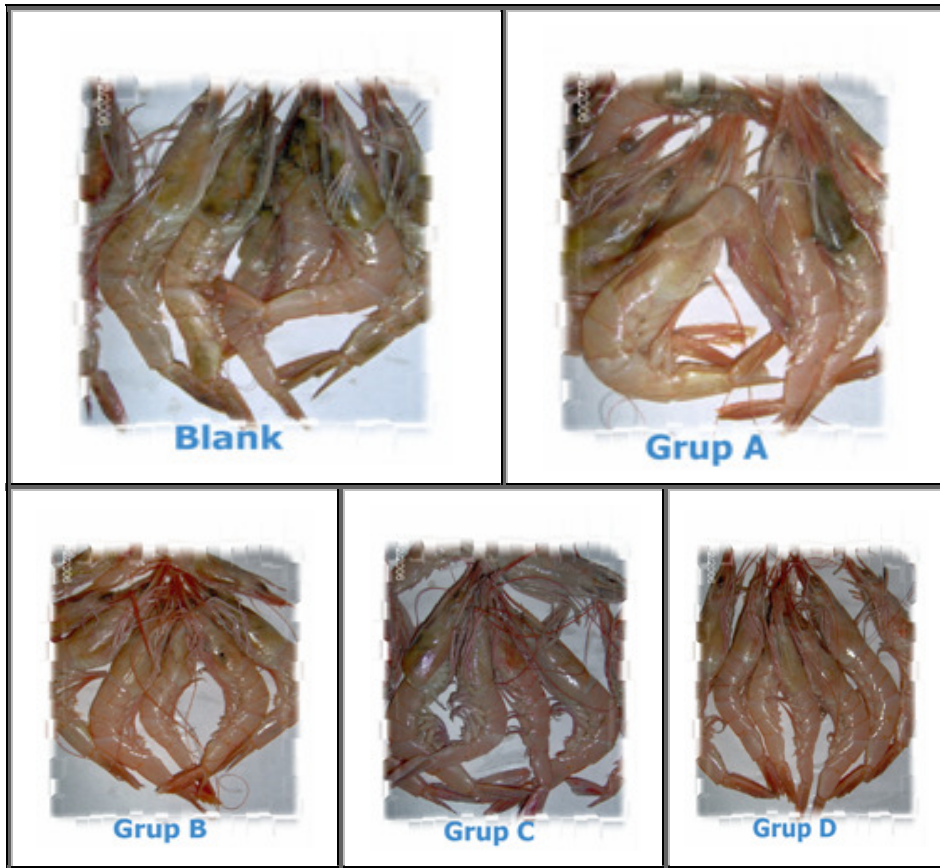
2.gün örneklerde renk ve doku bütünlüğü gayet iyidir. Melanosis oluşumu henüz çok erken safhalarındadır. Grup C ve Grup D örneklerinde 4HR partikülleri hafif gözlenmektedir.

4.Gün:

Tablo 4. 3. Örneklerin 4. gün kayıtları



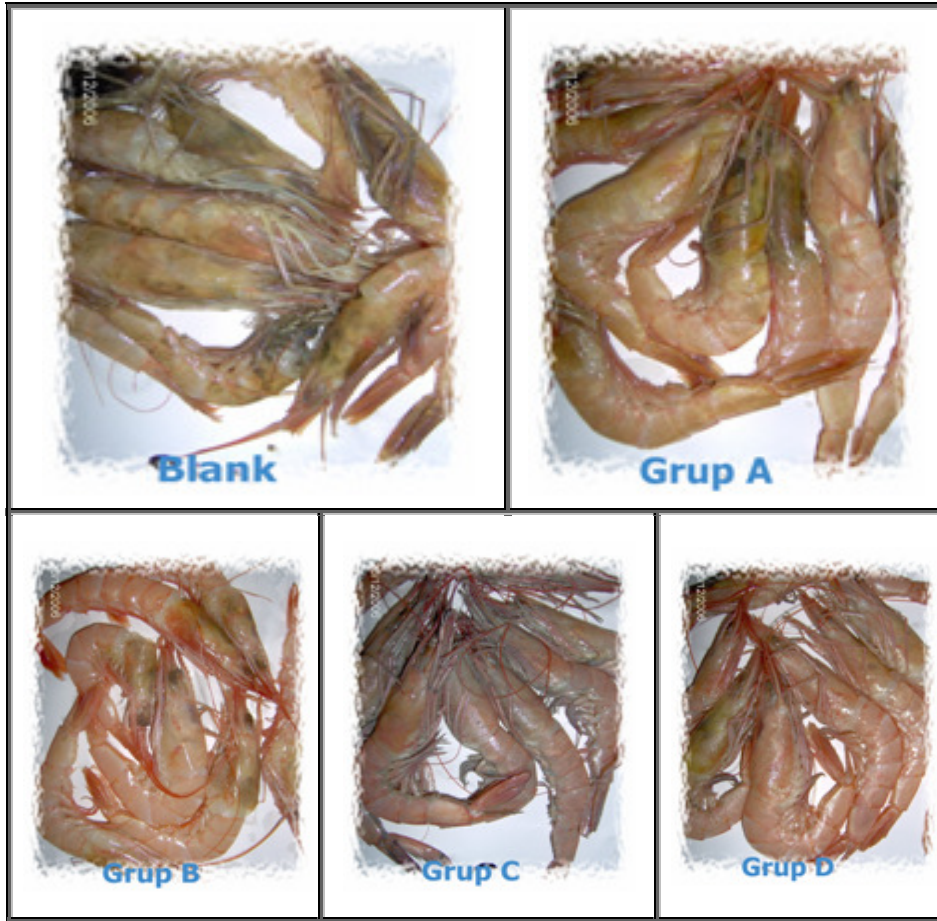
Kör örneklerde melanosis gelişimi belirmeye başlamıştır. Yüksek konsantrasyonlu gruplarda 4HR toz partikülleri halinde karideslerin ayak dipleri, karın bölgesi ve kuyrukta pembe birikimler yaptığı tespit edilmiştir.

7.Gün:**Tablo 4. 4.** Örneklerin 7. gün kayıtları

Kör örneklerdeki melanosis gelişim kabul edilebilir düzeyi aşmıştır. Örneklerdeki doku bütünlüğü bozulmaya başlamıştır. C ve D gruplarındaki kalıntılar daha belirgin ve yoğun haldedir.









13. Gün:

Tablo 4. 5. Örneklerin 13. gün kayıtları



A grubu ve kör örnekler, gerek melanosis durumu gerekse doku yapısı açısından tüketim için uygun değildir. B, C ve D grubu örneklerde melanosis uygun olmakla birlikte doku bozulmaları, kabuk parçalanmaları, ayak ve baş kısımlardaki kopmalar tüketici üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. C ve D grubu örnekler pembe 4HR kalıntıları sebebiyle mat bir görünüme sahiptir.

Tablo 4.6. A grubu örneklerde günlere bağlı melanosis gelişimi

2. Gün	 <p>2.Gün</p>	8. Gün	 <p>8. Gün</p>
4. Gün	 <p>4.Gün</p>	11. Gün	 <p>11.Gün</p>
6. Gün	 <p>6.Gün</p>	12. Gün	 <p>12.Gün</p>
7. Gün	 <p>7.Gün</p>	13. Gün	 <p>13.Gün</p>

4.2. Kalıntı Miktarları İçin Bulgular

Belirlenen günlerde karides örnekleri analiz prosedürüne uygun olarak ekstrakte edilip kalıntıları tespit için HPLC ye verildi. İlk gün örneklerindeki kalıntı miktarı cihazda meydana gelen küçük bir problem sebebiyle tespit edilememiştir. Ancak 2, 4, 7 ve 14. gün kalıntı miktarları verimli bir şekilde tespit edilmiştir (Örneklerin kromatogramları ve kalibrasyon değerlerinin bir kısmı EKLER bölümünde verilmiştir.) . Tespit edilen kalıntı miktarları tablodaki gibidir:

Tablo 4.7. Tespit edilen kalıntı miktarları (µg/Kg)

GÜNLER	Grup A (%0.0025)	Grup B (%0.05)	Grup C (%0.62)	Grup D (%0.1)
2.GÜN	48,266	412,064	4568,710	4995,400
	40,202	636,440	4595,000	16813,870
	42,622	680,199	4684,890	1516,685
Ortalama	43,697	576,234	4616,200	7775,318
4.GÜN	53,450	634,520	6235,260	2130,130
	60,489	786,720	6474,060	2037,320
	59,720	1233,250	6921,110	2788,730
Ortalama	57,886	884,830	6543,477	2318,727
7.GÜN	58,947	1295,080	10727,510	3138,750
	49,544	899,760	9959,370	2935,520
	47,384	1165,640	6923,210	3107,540
Ortalama	51,958	1120,160	9203,363	3060,603
14.GÜN	100,381	1274,720	18381,920	3720,600
	66,434	1371,940	21420,040	3489,680
	90,275	1469,500	22686,241	3287,320
Ortalama	85,697	1372,053	20829,400	3499,200

Numunelerle birlikte çalışılan kör ve yüklü örneklere bağlı olarak geri alımları % 82 ile % 115 arasında değişmektedir. Bu geri alımlara

bağlı olarak numunelerdeki gerçek kalıntı miktarları şu şekilde gerçekleşmiştir:

Tablo 4.8. Geri alımlara bağlı olarak düzeltilmiş kalıntı miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Ort: Ortalama **SD:** Standart Sapma **RSD:** Rölatif Standart Sapma

GÜNLER	Grup A (%0.0025)	Grup B (%0.05)	Grup C (%0.62)	Grup D (%0.1)
2.GÜN	41,967	358,290	3972,493	4343,500
	34,956	553,385	3995,353	14619,660
	37,060	591,433	4073,512	1318,758
Ort.	37,994	501,036	4013,786	6760,639
SD	2,938	102,125	43,251	5692,710
RSD	7,732	20,383	1,078	84,204
4.GÜN	46,475	551,715	5421,559	1852,148
	52,595	684,053	5629,195	1771,450
	51,927	1072,311	6017,905	2424,801
Ort.	50,332	769,360	5689,553	2016,133
SD	2,741	220,927	247,170	290,844
RSD	5,446	28,716	4,344	14,426
7.GÜN	61,403	1349,033	11174,418	3269,510
	51,608	937,244	10374,277	3057,814
	49,358	1214,201	7211,631	3237,000
Ort.	54,123	1166,826	9586,775	3188,108
SD	5,229	171,417	1710,953	93,083
RSD	9,661	14,691	17,847	2,920
14.GÜN	123,178	1564,209	22556,454	4565,548
	81,521	1683,508	26284,531	4282,186
	110,776	1803,223	27838,286	4033,870
Ort.	105,158	1683,647	25559,757	4293,868
SD	17,464	97,577	2216,365	217,214
RSD	16,607	5,796	8,671	5,059

Yukarıdaki ifadeler kalıntı miktarlarının $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) cinsinden ifadeleridir. Ekstraksiyon süresince numune 40 kat dilue edildiği için

kalıntı miktarları yukarıdaki değerlerin 40 katı hesaplanarak kg miktara karşılık gelen kalıntı miktarları tespit edilmiş olacaktır. Bu durumda;

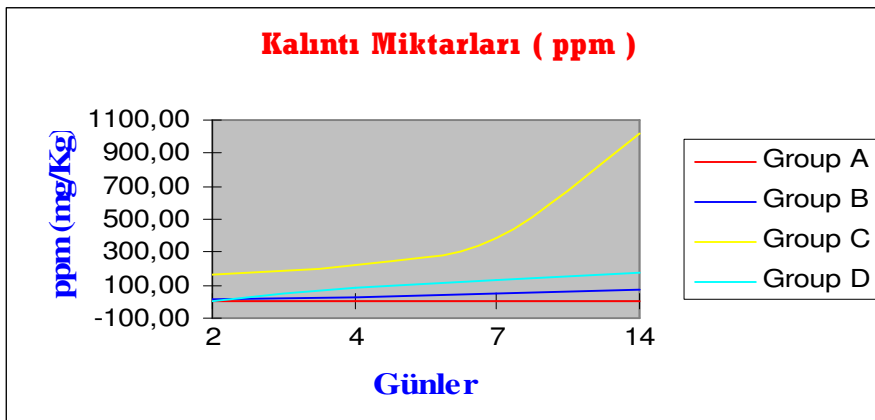
Tablo 4.9. Kalıntı miktarlarının ppm (mg/kg) olarak değerleri

* : Değerler arasında bir korelasyon olmadığı için hesaplanmamıştır.

Günler	Gruplar			
	A	B	C	D
2	1,52	20,04	160,55	---*
4	2,01	30,77	227,58	80,65
7	2,16	46,67	383,47	127,52
14	4,21	67,35	1022,39	171,75

Kalıntı miktarlarını grafiksel olarak ifade edecek olursak;

Tablo 4.10. Kalıntı miktarları



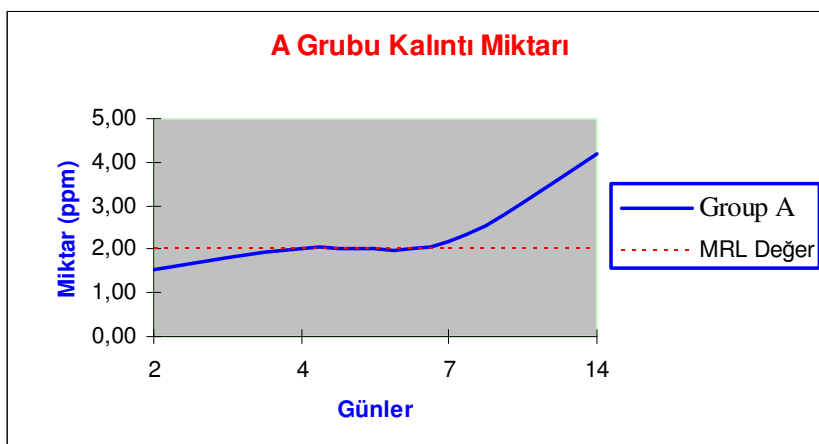
Tablolardaki değerlerden de anlaşılacağı üzere A Grubu dışındakiler Avrupa Birliği MRL (Maximum Residue Limits, Maksimum Kalıntı Seviyeleri) değeri olan 2 mg/kg seviyesini daha ilk günden aşmış bulunmaktadır. Bu sebeple A Grubu örneklerini ayrıntılı olarak incelenirse A grubu örneklerin kalıntı miktarları ve günlük yüklü numunelerin geri alımları birlikte değerlendirildiğinde;

Tablo 4.11. A grubu kalıntı miktarları ve geri alımlar

Günler	Grup A (%0.0025)	Geri alımlar
2	1,52	115
4	2,01	115
7	2,16	96
14	4,21	81,5

MRL seviyeye bağlı olarak grafiksel değerlendirildiğinde ise;

Tablo 4.12. A Grubu kalıntı miktarı grafiksel değerlendirme



Tabloda anlaşıldığı üzere örneklerdeki kalıntı miktarları ilk 4 gün içinde MRL seviyenin altındadır. 4 ile 7. günler arasında ise sınır seviyede kalıntı içermektedir. Ancak 7 günden sonra seviyeyi aştığı için AB kalıntı yönetmeliğince tüketimine izin verilmeyecektir. Burada dikkati çekecek bir nokta şudur ki; bir haftalık bir sürede melanosis gelişimi, skala değeri olarak sadece 4'e kadar yükselmiştir (Tablo 10). Aynı süreçte kalıntı miktarı ise MRL seviyelerdedir (Tablo 15). 4HR uygulanmış örnekler, kör grup örneklerin 3. günden sonra ulaştığı melanosis seviyesine 7.günden sonra ulaşmıştır. Yani raf ömrünü neredeyse iki kat arttırmış ve kalıntı yönünden riskli seviyelerin altında kalmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma karideslerde 4HR uygulaması sonucu gözlenen melanosis gelişiminin değerlendirilmesi ve 4HR kalıntılarının günlere bağlı değişiminin tespiti için yapılmıştır.

Çalışma örnekleri aynı zamanda, aynı bölgede ve trol ile avlanmıştır. Gruplara ayrılarak örneklerin her biri farklı konsantrasyonlardaki 4HR solüsyonuna daldırılmışlardır. Daldırma süresi sabit olup 2 dk'dır.

Melanosis gelişimi dijital görüntüleri kaydedilerek günlük olarak takip edilmiştir. Melanosis oluşumu 4. günden sonra hızlandığı ve 4HR uygulanmamış blank (Kör) örneklerde 5.günden sonra dokunun uygun olmadığı gözlenmiştir. %0,62 ve % 0,1'lik konsantrasyonlarda 4HR uygulanmış örneklerde 14 gün içinde herhangi bir melanosis oluşumu gözlenmemiştir. Ancak dokunun yapısını koruyamaması ve 4HR'nin karapaks, bacak dipleri ve baş bölgesinde yoğun birikimi tüketici beğenisi açısından olumsuz olduğunu düşündürmektedir. Melanosis gelişimi yönünden, % 0,0025 , %0,05 , %0,62 ve %0,1 konsantrasyonlarındaki 4HR uygulanmış her bir grup tatmin edici sonuçlar vermiştir. İlk 7 günlük tüketim periyodu için melanosis oluşumu kabul edilebilir düzeyi aşmamıştır.

Melanosis önlemede 4HR, %0,0025 gibi düşük bir konsantrasyonda bile etkili olmuştur. Montero et al. (2005), çalışmalarında 4HR'nin değişik konsantrasyonlarda melanosis inhibisyonunda etkilerini çalışarak 6. güne kadar %0,0025 konsantrasyonda kullanımında skala değeri olarak 4'ü aşmadığını göstermişlerdir. Aynı çalışmalarında % 0,05 – 0,01 – 0,1 – 0,5 – 1 -5 konsantrasyonlarını da denemişlerdir. Melanosis skala değerinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda 12 gün sonrasında bile 2 değerini aşmadığını belirtmişlerdir. Yapılan çalışma bu verileri destekleyerek % 0,0025'lik konsantrasyonda melanosis değeri olarak 7. günde 4 değerine ulaşmıştır.

Kalıntı analizleri için HPLC-FLD kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki her bir grup 3 paralel örnekle çalışılmıştır. Paraleller arası rölatif standart sapma ortalama olarak 10,89 olarak gerçekleşmiştir. Hatta bazı grup örneklerde rölatif standart sapma 1,07 gibi oldukça iyi değerlere ulaşmıştır.

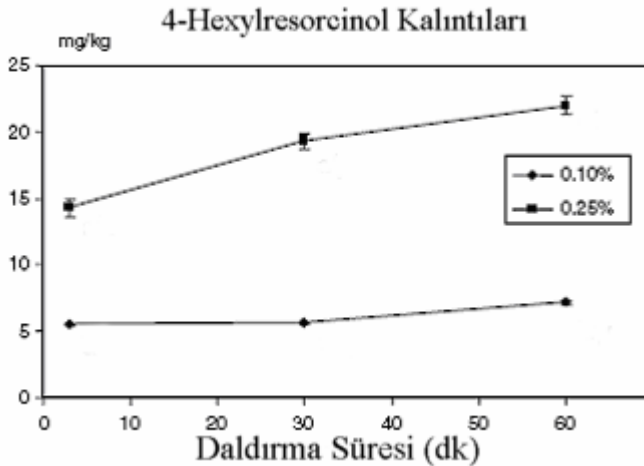
Uygulanan 4HR konsantrasyonu arttıkça dokuda bıraktığı kalıntı seviyesi de benzer olarak artmıştır. En yüksek kalıntı miktarı, %0,62

konsantrasyondaki 4HR içine daldırılmış olan Grup C örneklerinden elde edilmiştir. Değer olarak en yüksek miktar 14. gün analizlerinde Grup C örneklerinde ortalama 1022,39 mg/kg olarak tespit edilmiştir. En düşük değer ise 2.gün analizlerinde A Grubu örneklerinde 1,52 mg/kg olarak kaydedilmiştir.

Çalışma standartları olarak 25 – 50 – 75 – 100 ppb'lik 4HR standartları kullanılmıştır. “0” noktası dahil toplam 5 noktadan geçecek şekilde hazırlanan kalibrasyon eğrisi 0,9998 korelasyon ile sonuç vermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda 4HR kalıntısının günlere bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Grup A örneklerinde 2.gün kalıntı miktarı 1,52 mg/kg, 4.gün kalıntı miktarı 2,01 mg/kg, 7.gün kalıntı miktarı 2,16 mg/kg ve 14.gün kalıntı miktarı 4,21 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Değerler kalıntı miktarının arttığını göstermektedir (Tablo 4.12).

Montero et al. (2005); yaptıkları çalışmalarında %0,01'lik 4HR uygulamasında 2.gün 2,73 mg/kg, 4.gün 3,22 mg/kg, 7.gün 2,57 mg/kg ve 5.gün 5,91 mg/kg kalıntı miktarı tespit etmiştir. Benzer şekilde Mendes et al. (2005), yaptıkları çalışmada kalıntı miktarının daldırma süresi arttıkça ve daldırma solüsyonunun konsantrasyonu yükseldikçe 4HR kalıntı miktarlarında artış olduğunu göstermişlerdir.

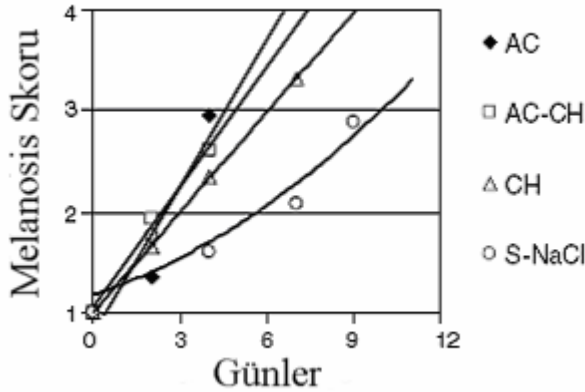


Şekil 5.1. Kalıntı miktarlarındaki artış (Mendes et al. , 2005)

Kalıntı analizleri için Jonker and Dekker (2000) uyguladıkları metod kullanılmıştır. Mendes et al. (2005), işleme sürecinde 4HR kalıntı miktarlarının değişimin inceledikleri çalışmalarında yine Jonker and Dekker'in (2000) metodunu tercih etmiştir. Ancak bazı çalışmalar 4HR analizlerinde farklı metod ve yöntemlerin de kullanılabileceğini göstermektedir. Montero et al. (2005), çalışmalarında Smallwood et al. (1998)'e ait metodu tercih etmişlerdir.

4HR'nin ticari olarak kullanımı yaygın değildir. Mevcut şartlarda su ürünleri sektöründe kullanımı yönünde sadece bir yurtdışı firması göze çarpmaktadır. ABD'de EverFresh™ adı ile piyasaya sunumu söz konusudur. Bu firma dışında ticari olarak arzına rastlanmamıştır. EverFresh™, 4HR'yi sodyum kloridle kompoze ederek piyasaya vermektedir.

Enzimatik inhibitörlerin bir arada kullanımı melanosis önlemede daha etkili olduğu yönünde bazı çalışmalar yapılmıştır. Özellikle Montero et al.(2005) ayrıntılı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarının neticesinde aşağıdaki tablodaki değerleri elde etmişlerdir:



Şekil 5.2. Enzimatik inhibitörlerin bir arada kullanımı (Montero et al., 2005)

AC: %0,5 Askorbik asit, %0,5 Sitrik asit ve %0,3 Asetik asit içeren 4HR

CH: 450 mg/kg EDTA ve %1,5 Sodyum Piyrofosfat içeren 4HR

AC+CH: %0,5 Askorbik asit, %0,5 Sitrik asit, %0,3 Asetik asit, 450 mg/kg EDTA ve %1,5 Sodyum Piyrofosfat içeren 4HR

S-NaCl: Sorbitol ve NaCl içeren 4HR'nin serpmeye olarak kullanımı

Yapılan çalışma, 4HR'nin tek başına kullanımının da melanosis önlemede oldukça etkili olduğunu göstermiştir.

4HR alışmaları henüz yeni yeni başlamıştır. İlk alışmalar 1990'lı yıllarda yapılmaya başlamıştır. Konunun yeni olması, yeni çalışılmaya başlamış olması bu konuda bazı eksikliklere neden olmuştur. Çalışmaların büyük bir kısmı belli türlerle sınırlı kalmıştır. Özellikle *P.longirostris* üzerinde çalışılmıştır. Mendes et al. (2005), yine aynı şekilde *P.longirostris*'te 4HR kalıntı miktarlarının işleme sürecindeki değişimlerini çalışmıştır. Lopez et al. (2005), 4HR içeren uygulamalarla Norveç ıstakozu *Nephrops norvegicus*'ta kalite değişimlerini incelemiştir. Otwell and McEvily (1990), EverFresh™ ile %0,0005 gibi düşük konsantrasyonda *P.duarorum*'da melanosisi etkili bir şekilde önlediğini bildirmişlerdir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Karideslerde yapılan incelemeler sonucunda, melanosis için kabul edilebilir düzeye kadar değerler ilk hafta korunabilmiştir. %0,0025 konsantrasyonda 4HR uygulanmış Grup A örneklerinde 7.güne kadar melanosis değeri 4'ü aşmamıştır. %0,05 konsantrasyonda 4HR uygulanmış Grup B örneklerinde ise 12.güne kadar melanosis değeri 4 skala (Otwell and Marshall, 1986) değerini aşmamıştır. Grup C örneklerinde ise %0,62 konsantrasyonunda 4HR uygulanmış ve melanosis değeri iki hafta süresince 2 değerini aşmamıştır. Grup D, %0,1 konsantrasyonda 4HR uygulanmış örnekler olup benzer şekilde iki haftalık bir sürede 3 değerini aşmamıştır. Sonuçlar ışığında, 4HR melanosis oluşumunun önlenmesinde düşük konsantrasyonlarda bile oldukça etkilidir.

Kalıntıların tespiti için HPLC-FLD kullanılmıştır ve günlere bağlı olarak bu miktarlar farklılık göstermiştir. A Grubu (%0,0025) örneklerin kalıntı miktarları 2.günden 14. güne kadar 1,52 mg/kg'dan 5,24 mg/kg'a yükselmiştir. B Grubu (%0,05) örneklerin ise 20,04 mg/kg'dan 67,35 mg/kg'a yükselmiştir. C Grubu (%0,62) örneklerinde 2.gün analizlerinde 160,55 mg/kg kalıntı tespit edilmişken 14.gün 1022,39 mg/kg kalıntı tespit edilmiştir. D Grubu örneklerde ise 80,65 mg/kg ile 171,75 mg/kg aralığında kalıntı tespit edilmiştir.Yapılan çalışmalar sonucunda kalıntı miktarlarının günlere bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda *Parapenaeus longirostris* türü karides kullanılmıştır. Bilimsel çalışmaların büyük bir kısmı da tercihini bu türden yana kullanmıştır. Sadece birkaç çalışma *Nephrops norvegicus*, *P.duarorum* gibi diğer cins ve türlerde uygulanmıştır. Farklı türlerde 4HR'nin uygulanarak incelenmesi, değerlendirilmesi 4HR'nin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

4HR konusunda bilimsel veri azlığı, araştırmaların kapsamlı olmayışına dolayısıyla sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmasına neden olmaktadır. Hali hazırda 4HR'nin ham materyalinin temininin yurtdışına dayanması kullanımını direkt etkilemektedir. Bilimsel çalışmaların desteklenerek bu çalışmalar ışığında ticari üretimin teşviklenmesi 4HR kullanımını olumlu yönde etkileyecektir.

Sağlık yönünden risk taşımayan, melanosis önlemede oldukça etkili olan 4HR, su ürünleri sektöründe özellikle kabuklu sektörde giderek

önem kazanmaktadır. Bilimsel çalışmalarla birlikte 4HR'nin kullanımının teşviki sektörel açıdan önemlidir.

4-Hexylresorcinol düşük konsantrasyonlarda bile etkin biçimde melanosis oluşumunu engellemiştir. Ekolojik olarak hızla kirlenen dünyamızda, düşük konsantrasyonlardaki kimyasal kullanımı son derece önem kazanmaktadır. % 0,0025 gibi düşük bir konsantrasyonda 4HR'nin kullanımı, hem etkili bir inhibisyon sağlayacak hem de çevreye minimum düzeyde kalıntı bırakacaktır. Diğer melanosis inhibitörlerine alternatif olarak kullanılan 4HR, toksikolojik olarak bunlarla kıyaslanmayacak derecede zararsızdır. Özellikle boğaz pastillerinde antiseptik madde olarak kullanılması, sodyum metabisülfid gibi sağlık açısından son derece zararlı maddelere, alternatif olarak dikkate değer bir özelliktir. Ayrıca uygulama esnasında, avlama sonrası veya işleme sürecinde, üst solunum yolları üzerinde herhangi bir tahriş edici veya irritasyona neden olmamaktadır. Sülfid gibi kimyasallar özellikle uygulama esnasında solunum yollarında, burun ve gözlerde ciddi tahrişlere neden olmaktadır.

Alternatif melanosis inhibitörü olan 4-Hexylresorcinolün kullanımı, mevcut şartlarda madde temininin yurtdışına dayanması, diğer inhibitör maddelere kıyasla biraz daha pahalı olması ve bu konudaki çalışmaların yeni yeni başlamış olması gibi sebepler nedeniyle direkt etkilenmektedir.

Sonuç olarak; yapılan çalışmalar ışığında, melanosis önlemede bu derece etkili bir kimyasal olan 4-Hexylresorcinolün karides gibi ekonomik değere sahip ürünlerde raf ömrünü uzatması, tüketici göz zevkini koruması ve sağlık yönünden , diğer melanosis inhibitörlerine tercihen kullanılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Anonim, (2003). Scientific Committee on Food of the European Commission, SCF/CS/ADD/ CONS/50 Final

Anonim, (2004). 2002 Yılı Su Ürünleri İstatistikleri, DİE, Ankara

Anonim, (2004). 5782/05 Council Of the European Union, Brussels,3 Feb 2005, 2004/0237 (COD)

Anonim, (2006). Directive 2006/52/EC of the European Parliament and Council of 5 July 2006, Off J. Eur Union

Andrawis A. and Kahn V., (1985). Inactivation of mushroom tyrosinase by tropole, Department of Food Technology, Agricultural Research Organization, Israel. Phytochemistry, Volume 24, Issue 3, 1985, Pages 397-405

Başçınar, N.Selda (2004). Su Ürünleri Merkez Arşt. Enst., Trabzon

Chen W. and Challa G., (1992). Oxidative coupling polymerization of 2,6-dimethylphenol catalysed by copper(II) complexes by n-methylimidazole. European Polymer Journal, Volume 26, Issue 11, 1990, Pages 1211-1216

Frankos, V. H., Schmidtt, D. F., Haws, L. C., McEvily, A. J., Iyengar, R., Miller, S. A., et al., (1991). Generally Recognised As Safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 14, 202–212.

Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F., (1985). Pharmacological Basis of Therapeutics. Antiseptics and disinfectants. Chap.41, 7th ed., Macmillan Publishing Co., NY, NY, p.970.

Guandalini, E., Ioppolo, A., Mantovani, A., Stacchini, P., Giovanni, C., (1998). 4- hexylresorcinol as inhibitor of shrimp melanosis:

efficacy and residue studies evaluation of possible toxic effect in a human intestinal in vitro model (Caco-2); preliminary safety assessment. *Fd.Add.Contam.*, 15(2), 171-180.

Jonker K.M. and Dekker C., (2000). Determination of 4-Hexylresorcinol in Shrimp by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *J.AOAC Int* 83(1):241–244

Iyengar, R., Bohmont, C.W., McEvily, A.J., (1991). 4-Hexylresorcinol and prevention of shrimp melanosis: residual analyses. *J. Food Comp. Anal.*, 4: 148-157.

King, J.M., McEvily, A.J., Iyengar, R., (1991). Liquid chromatographic determination of the processing aid 4-hexylresorcinol in shrimp. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74: 1003-1005.

Lambrecht, H. S. (1995). Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. In C. Y. Lee & J. R. Whitaker (Eds.), *Enzymatic browning and its prevention* (pp. 313–323). Washington: American Chemical Society.

Marshall M.R., Kim J. and Wei C., (2000). Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. FAO <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>

Martinez, M.V. , Whitaker, J.R., (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Sci. Technol.*, 6(6): 195-200.

Mendes, R., (2005). Crustaceans Melanosis Inhibitors and Processing Technology. <http://ipimar-iniap.ipimar.pt/pdf-docs/PROJECTOS%20CONCLUIDOS/Guidebook.pdf#search=%20melanosis%20inhibitors%22>

Mendes R., Pestana J., Pestana C., (2005). Changes in 4-hexylresorcinol residues during processing of deepwater pink

shrimp (*Parapenaeus longirostris*), *Eur Food Res. Technol.* (2005) 00, DOI 10.1007/s 00217-005-0231-7

McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., (1990). New processing aid for the inhibition of shrimp melanosis. *Proc. 15th Tropical and Subtropical Fish. Tech. Conf., Orlando, FL.*
<http://sst.ifas.ufl.edu/15thann.html>

McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., (1991). Sulfite alternative prevents shrimps melanosis. *Food Technology*, 9, 80–86.

Montero, P., Avalos, A., Pe´rez-Mateos, M., (2001). Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 75, 317–324.

Montero, P., Mart´ınez-Alvarez, O., Go´mez-Guille´n, M. C., (2004). Effectiveness of on-board application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Journal of Food Science*, 69(8), 643–647.

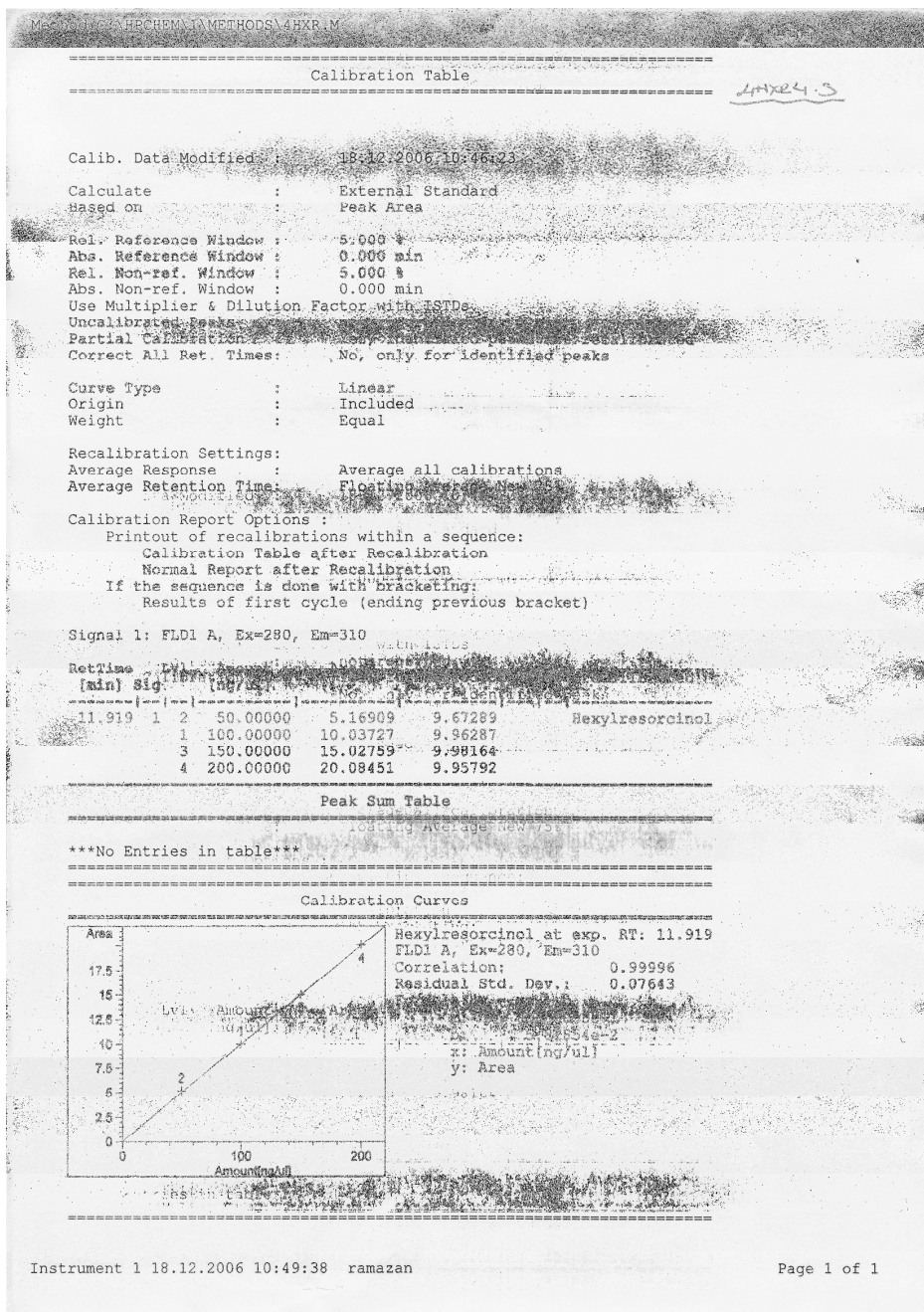
Montero, P., Martinez-Alvarez, O., Gomez-Guillen, M.C., Zamarano, J.P., Alique, R., (2005). Melanosis Inhibition and 4-Hexylresorcinol Residual Levels In Deepwater Pink Shrimp (*P. longirostris*) Following Various Treatments. *European Food Research and Technology* Vol.223, N.1 p.16-21

Otwell, W.S. and Marshall, M.R., (1986). Studies on the use of sulfites to control shrimp melanosis (blackspot): Screen alternatives to sulfiting agents to control shrimp melanosis. *Florida seagrass technical paper No. 46: 1-10.*

Otwell, W. S., Iyengar, R., Mc Evily, A. J., (1992). Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 53–65.

- Robbins, B.H., (1931).** Quantitative studies on the absorption and excretion of hexylresorcinol and heptylresorcinol under different conditions. *J.Pharmacol.Exper.Ther.* 43, 325-333.
- Sanchez-Ferrer A., Bru R. and Garcia-Carmona F., (1989).** Kinetic properties of polyphenoloxidase in organic solvents.A study in Brij 96-cyclohexane reverse micelles. *Vol.233, N-2, p.363-366*
- Slattery, S.L., Williams, D.J., Cusack, A., (1995).** A sulphite-free treatment inhibits blackspot formation in prawns. *Food Australia,* 47(11), 509-514.
- Smallwood A.W., Ranieri T.L., Satziger R.D., (1998).** *Journal of AOAC Int.* 81(2), 488-497
- Taoukis, P.S., Labuza, T.P., Lillemo, J.H., Lin, S.W., (1990).** Inhibition of shrimp melanosis (black spot) by ficin. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie,* 23, 52–54.
- Veronika R. M., (2004)** Practical High-Performance Liquid Chromatography FOURTH EDITION Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA), St. Gallen, Switzerland
- Wagner, T. and Finne, G., (1986).** Evaluation of Alternatives to Sulfiting Agents as Melanosis Inhibitors in Raw Shrimp. Tech. pap. Of the Florida Sea Grant Prog. <http://sst.ifas.ufl.edu/11thann.html>

EKLER

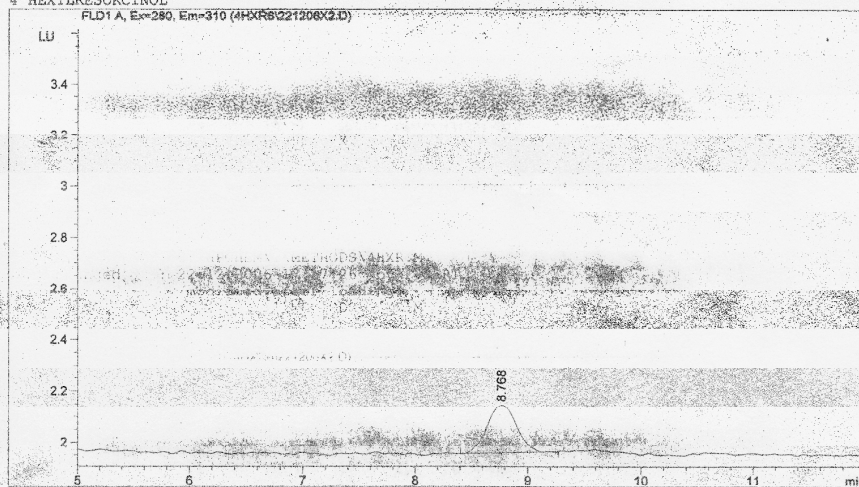


Data File C:\HPCHEM\1\DATA\4HXR6\221206X2.D

Sample Name: SPK 1

```

Injection Date : 22.12.2006 17:40:47      Seq. Line : 12
Sample Name    : SPK 1                    Location  : Vial 8
Acq. Operator  : F.SERT                   Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume: 25 ul
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\4HXR.M
Last changed   : (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\4HXR.M
Last changed   : 25.12.2006 10:49:18 by F.SERT
4 HEXYLRESORCINOL
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 25.12.2006 10:02:09
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=260, Em=310

RetTime [min]	Type	Area LU*s	Ant/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
8.768	PB	3.41405	12.92303	44.11986		Hexylresorcinol

Totals :

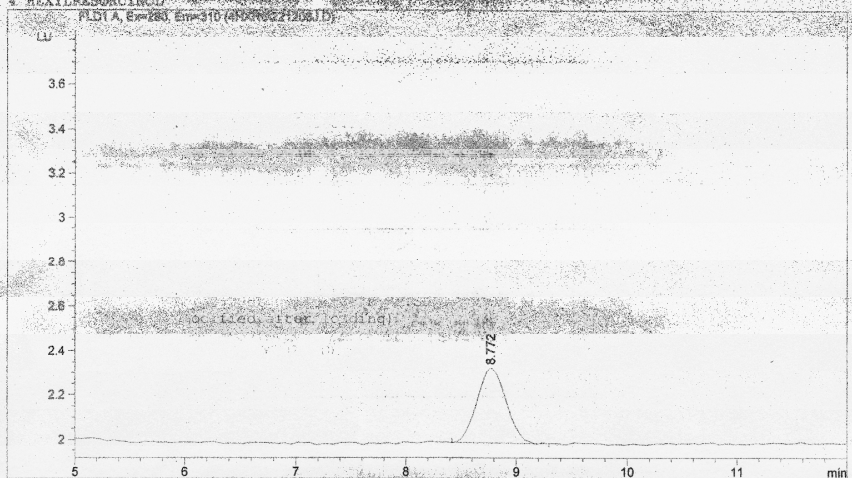
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\4HXR6\221206J.D Sample Name: A1

Injection Date : 22.12.2006 18:38:55 Seq. Line : 16
 Sample Name : A1
 Acq. Operator : F.SERT
 Acq. Instrument : FID
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\4HXR.M
 Last changed : 22.12.2006 17:17:26 by F.SERT
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\4HXR.M
 Last changed : 25.12.2006 09:42:07 by F.SERT
 (modified after loading)

4. HEXYLRESORCINOL



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 22.12.2006 19:16:27
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A, Em-280, Em-310

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ng/ul]	Grp Name
8.772	PP	6.08090	13.45212	81.80108	Hexylresorcinol

Totals : 81.80108

Results obtained with enhanced integrator

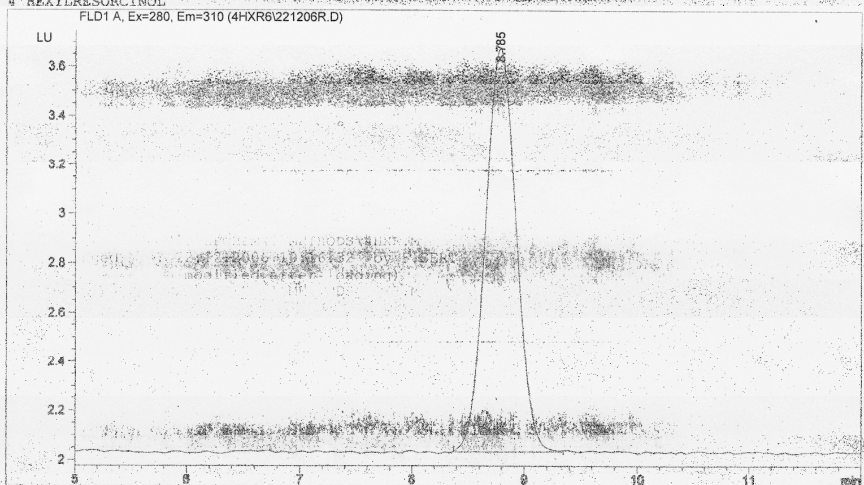
*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\4HR6\221206R.D Sample Name: C2

Injection Date : 22.12.2006 20:49:30 Seq. Line : 25
 Sample Name : C2 Location : Vial 18
 Acq. Operator : F.SERT Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 25 ul
 Acq. Method : FLD1 A, Ex=280, Em=310 (4HR6221206R.D)
 Last Chg : (modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\4HR.M
 Last changed : 25.12.2006 10:46:57 by F.SERT
 (modified after loading)

4 HEXYLRESORCINOL



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 25.12.2006 10:02:09
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISFDs

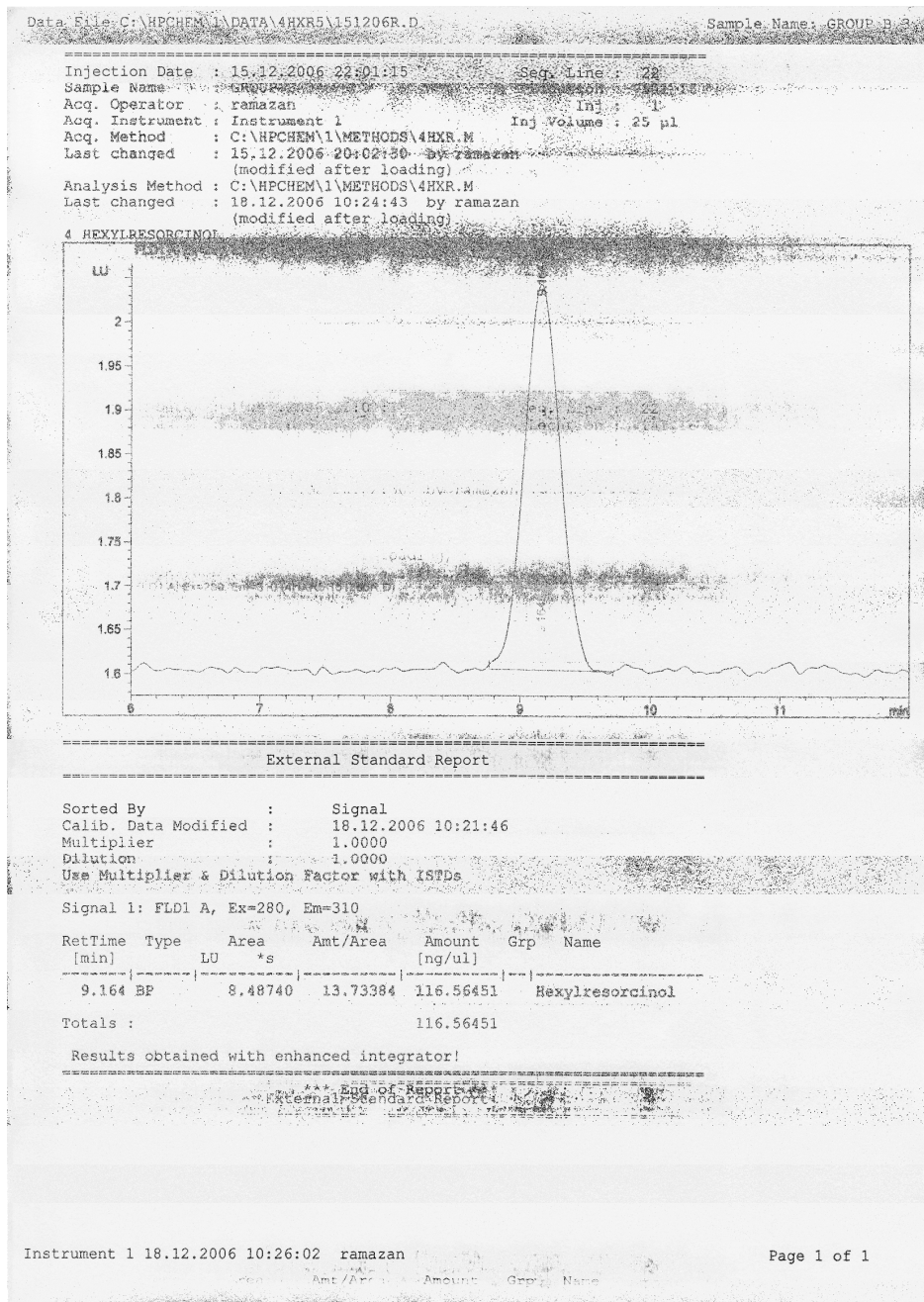
Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=310

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ng/ul]	Grp Name
8.785	BB	31.17597	13.99735	436.38087	Hexylresorcinol

Totals : 436.38087

Results obtained with enhanced integrator

*** End of Report ***



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Afyonkarahisar’da doğdu. İlk ve ortaokulunu Afyon’da, liseyi ise Ankara Laborant Meslek Lisesi’nde tamamladı. 1998 yılında Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Burdur İl Kontrol Laboratuvarı’nda laborant olarak göreve başladı. 2000 yılında Sinop Kümes Hayvanları ve Keçicilik Üretme İstasyonu Müdürlüğü’nde göreve başladığı aynı zamanda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sinop Su Ürünleri Fakültesi’ne başladı. 2004 yılında fakülteyi bitirdikten sonra 2005 yılında Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde Su Ürünleri Mühendisi olarak göreve başladı. Kalıntı Laboratuvarı’nda 3 yılı aşkın bir süre ile antibiyotik kalıntılarını HPLC ile analizlerini yürüttü. Bu süre zarfında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri İşleme Anabilim Dalı’nda sayın Prof. Dr. Şükran ÇAKLI danışmanlığında yüksek lisansa başladı. 2007 Nisan ayında, İzmir İl Kontrol Laboratuvarı’na tayini çıktı. Halen burada Mineral Analizleri Laboratuvarında mühendis olarak görev yapmaktadır.