

NAR KABUĞU EKSTRAKTININ ANTİMİKROBİYEL VE ANTIÖKSİDAN AKTİVİTESİNİN KÖFTE KALİTESİNE ETKİSİ

Hazret Özdemir¹, Ayla Soyer^{2*}, Şeref Tağı², Mehser Turan³

¹Et ve Süt Kurumu, Ankara

²Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

³Beğendik Mağaza İşletmeleri Ticaret ve Sanayi A.Ş., Ankara

Geliş tarihi / Received: 24.07.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 07.08.2014

Kabul tarihi / Accepted: 26.08.2014

Özet

Bu çalışmada, soğukta depolanan köftenin mikrobiyel ve oksidatif stabilitesine nar kabuğu ekstraktı (NKE)'nin etkisi araştırılmıştır. Nar kabuğundan elde edilen sulu ekstraktan liyofilize toz ekstrakt elde edilmiş ve köfte formülasyonuna %0.1 (NKE1), %0.2 (NKE2) ve %0.3 (NKE3) konsantrasyonlarında ilave edilmiştir. NKE içeren köfteler, %0.01 BHT içeren ve herhangi bir antioksidan kaynağı içermeyen kontrol örneklerle aerobik ortamda $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolama süresince karşılaştırılmıştır. NKE, BHT'den daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Antimikrobiyel aktivite testlerinde, kullanılan NKE konsantrasyonlarından %0.2 ve %0.3 test edilen bakterilerden sadece *Staphylococcus aureus* üzerine inhibitör etki göstermiştir. Köftede TAMB, TAPB gelişimi, kontrol ve BHT'li örneklerle karşılaştırıldığında NKE ilavesi ile baskılanmıştır. NKE konsantrasyonu arttıkça, Enterobacteriaceae sayısındaki artış daha az olmuştur. Diğer yandan Lipid oksidasyonu, artan NKE düzeyi ile geciktirilmiştir. Köfteye %0.2-%0.3 NKE ilavesi, kötü koku oluşumunu ve kokuşmanın algılanmasını 6 gün süreyle engellemiştir. Sonuç olarak, nar kabuğu, köftelerin raf ömrünü uzatmak amacıyla uygun bir doğal katkı maddesi olma potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: Nar kabuğu ekstraktı, mikrobiyel özellik, lipid oksidasyonu, köfte, soğuk depolama

EFFECTS of ANTIMICROBIAL and ANTIOXIDANT ACTIVITY of POMEGRANATE PEEL EXTRACT on THE QUALITY of BEEF MEATBALLS

Abstract

The antioxidant and antimicrobial effect of pomegranate peel extract (PE) was investigated in meatballs during refrigerated storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Lyophilised powder extract obtained from water extract of pomegranate peel was incorporated into freshly minced beef meat at 0.1%, 0.2% and 0.3% concentrations and the results from these incorporations were compared with 0.01% BHT added and control (without any antioxidant) samples. PE showed higher antioxidant activity than BHT. PE at 0.2% and 0.3% levels had antimicrobial activity against only *Staphylococcus aureus* among the bacteria tested. The growth of total viable microorganisms in meatball was significantly suppressed by PE addition as compared to control and BHT samples. The increase in Enterobacteriaceae counts was reduced by the increase in PE concentration during 6 days of storage. PE treatment (0.1% to 0.3%) reduced lipid oxidation. Addition of 0.2% and 0.3% PE into meatball prevented the perception of off-odors and putrefactive odors for 6 days. As a result, PE can be successfully used to extend shelf life of meatballs.

Keywords: Pomegranate peel extract, microbial characteristics, lipid oxidation, meatball, cold storage

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

soyer@ankara.edu.tr,

(+90) 312 203 3300/3648,

(+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Soğukta depolama, et gibi kolay bozulabilen gıdaların raf ömürlerinin uzatılması amacıyla yaygın olarak kullanılan bir muhafaza yöntemidir. Etin işlenmesi ve depolanması sırasında kalite kayıpları meydana gelir ve bu kayıpların başlıca nedenleri mikrobiyolojik faaliyet ve oksidatif reaksiyonlardır (1-4). Kıyım etlerde soğukta depolama sırasında mikrobiyel yük giderek artmaktadır. Yeni çekilmiş kıymada mikrobiyel yük 10^5 KOB/g'dan düşük olmalıdır ve yük 10^8 KOB/g'a ulaştığında bozulma algılanabilir düzeydedir (5). Soğukta depolanan etlerde başlıca Gram-negatif, psikrotrof ve aerob bakteriler faaliyet göstermektedir ve bunlar içerisinde *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Psychrobacter* türleri önemli olmaktadır (6). Diğer yandan Enterobacteriaceae familyasının psikrotrof olan üyeleri yine kontaminasyonla ete bulaşmakta ve soğukta depolama sırasında faaliyet göstermektedirler (7). Ette meydana gelen oksidatif reaksiyonlar ise lipidlerin ve proteinlerin parçalanması ile ürünün rengini, tadını, kokusunu ve tekstürünü etkileyen değişmelere neden olmaktadır (2, 8). Bu nedenle et ve et ürünlerinde yapılan araştırmalarda hedef, bir yandan bakteriyel faaliyeti kontrol altına almak diğer yandan da oksidasyonu geciktirmek olmalıdır. Kıyım çekme gibi boyut küçültme işlemi, yüzey alanının artmasına ve doku tahribatına neden olarak et yüzeyinin daha fazla oksijene maruz kalmasına, oksidasyon katalistlerinin biraraya gelmesine ve daha fazla mikrobiyel kontaminasyona neden olur. Et ürünlerinde mikrobiyolojik faaliyeti ve lipid oksidasyonunu geciktirmek için sentetik katkı maddeleri yaygın olarak kullanılmaktadır (3, 9, 10). Fakat sentetik antioksidanların (BHT, BHA, TBHQ gibi) karsinojenik etki gösterdiklerinin ortaya konulması (11, 12) ve kimyasal katkı maddelerine karşı gelişen tüketici endişesi nedenleriyle, doğal antioksidan ve antimikrobiyel özelliğe sahip bitkisel katkıların kullanımına ilgi giderek artmaktadır.

Son yıllarda bitki kaynaklı doğal katkı maddelerinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesine ve et ürünlerinde kullanılabilirliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalar artmıştır. Fenolik madde içeriği yüksek olan bitkisel ürünler doğrudan veya ekstraktları hazırlanarak mikrobiyel faaliyeti ve oksidasyon reaksiyonlarını geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır. Biberiye, yeşil çay, üzüm çekirdeği ve posası, mavi yemiş, sitrus meyveleri ve nar dane, zar ve kabuk ekstraktları antimikrobiyel ve antioksidan etkileri belirlenen, biyoaktif bileşiklerce zengin doğal gıdalardır (3, 4, 13-15). Bunlar içerisinde nar meyvesi, içerdiği fenolik bileşiklerin sağlık üzerine olan yararlı

etkileri nedeniyle birçok ülkede gıda destek maddesi veya ilaç olarak kullanılmaktadır. Narın danesi, zarı ve kabuğu gibi farklı bölümleri birçok biyoaktif madde içermektedir ve bu maddeler antioksidan, antiviral, antibakteriyel, anti-diyabetik gibi birçok biyoaktif etki göstermektedirler (15). Nar kabuklarından elde edilen ekstraktın (249.4 mg/L), pulptan elde edilen ekstraktta (24.4 mg/L) göre yaklaşık 10 kat daha fazla toplam fenolik madde içerdiği saptanmıştır (16). Nar suyu üretiminde, narın daneleri ve kabuğuyla birlikte preslenmesi ile geride kalan posa yaklaşık %73 kabuk ve %27 dane içermektedir ve kabuk kısmı proantosiyanidinler, flavonoidler ve kondanse tanenler yönünden zengin bir kaynaktır (17, 18). Nar kabuğu, antioksidan ve antimikrobiyel etkisinin diğer kısımlarından daha fazla olduğunun ortaya konulması ile son yıllarda önem kazanmıştır (19-21). Nitekim et ürünlerine doğal antioksidan ve antimikrobiyel kaynağı olarak nar kabuğundan elde edilen ekstrakt kullanımı dikkat çekmektedir. Nar kabuğu ekstraktı pişmiş ve soğukta depolanan tavuk ürünlerinde (22, 23), et patede (24), çiğ olarak soğukta depolanan kıyım domuz etinde (25) çalışılmış ve depolama ömrünü artırmada etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar, soğuk depolamada kısa raf ömrüne sahip köftelerin depolama ömrünü artırmada NKE'nin etkisi olabileceği düşüncesiyle planlanmıştır. Bu çalışmada hedeflenen amaçlar; (1) NKE'nin antioksidan ve antimikrobiyel etkisini belirlemek, (2) farklı NKE konsantrasyonlarının köftenin mikrobiyel ve oksidatif kalitesine etkisini soğukta depolama sırasında ortaya koymaktır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Nar Kabuğu ve Ekstrakt Eldesi

Çalışmada, meyve suyu üretiminde en çok tercih edilen, Hicaznar çeşidi nar (*Punica granatum* L.) kullanılmıştır. Nar kabukları, Ziraat Fakültesi Meyve Suyu İşletmesi (Ankara)'nden temin edilmiştir. Sağlıklı nar meyveleri paketli presde (Bucher-Guyer, Niederweningen, İsviçre) preslendikten sonra atık olarak ortaya çıkan posa bekletilmeksizin alınmış ve kullanılacağı zamana kadar -18 °C'de dondurularak depolanmıştır. Liyofilize nar kabuğu ekstraktı Kanatt (23)'in yöntemine göre elde edilmiştir. İyice daneden temizlenmiş 100 gram nar kabuğu 1 cm² büyüklüğünde parçalara kesilmiş ve 1000 mL destile su ile 1 saat geri destile edilmiştir. Karışım soğutulmuş ve 12 kat tülbentten filtre edilmiştir. Kaba kısımlar tekrar destile su ile 1 saat süreyle destilasyon işlemine tati tutulmuş ve tülbentten filtre edilmiştir. Elde edilen sıvı ekstraktlar birleştirilmiş ve 12100xg'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatant toplanarak, döner evaporatörde

(Heidolph Laborata 4003, Almanya) konsantre edilmiştir. Elde edilen konsantre, liyofilizatörde (Labconco 74200, A.B.D.) -85 °C'de ve 120 mBar vakum altında kurutulmuştur. Liyofilize nar kabuğu ekstraktı (NKE), kullanılacağı zamana kadar 4 °C'de depolanmıştır.

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı Singleton ve Rossi (26) tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiştir. Örnek absorbansı spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda şahit çözeltiliye karşı okunmuştur. Örnekte ölçülen absorbans değerinin gallik asit cinsinden eşdeğeri olan fenolik bileşik miktarı, gallik asit ile hazırlanmış olan standart kurvenin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Örnekteki toplam fenolik bileşik miktarı "mg gallik asit/100 g ekstrakt" cinsinden ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivite

Nar kabuğu ekstraktı (NKE)'nin antioksidan aktivitesi Arts vd. (27) tarafından önerilen ABTS yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde, 7 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat içeren çözelti 20°C'de 24 saat karanlıkta bekletilerek ABTS^{•+} radikalinin oluşması sağlanmaktadır. Çift hüzmeli bir spektrofotometre (Labomed UVD-3200, Culver City, CA, A.B.D.) kullanılarak, 734 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Seyreltilmiş ABTS^{•+} çözeltisinin absorbansı kaydedilmiş ve sırasıyla 990; 980 ve 970 µL'lik hacimlere 10, 20 ve 30 µL seyreltilmiş örnek aktarılmış ve 6 dakika sonra absorbansları kaydedilmiştir. Örneklerin antioksidan aktivitesi, örneğe ait yüzde inhibisyon eğrisinin eğiminin, troloks standart eğrisinin eğimine oranlanmasıyla belirlenmiştir. Sonuçlar "TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; troloks eşdeğer antioksidant kapasitesi) değeri" olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Inhibisyon oran (\%)} = \frac{\text{Başlangıç absorbans değeri} - 6. \text{ dakika sonundaki absorbans değeri}}{\text{Başlangıç absorbans değeri}} \times 100$$

Antimikrobiyel Aktivite

Test organizmaları

Nar kabuğu ekstraktında antimikrobiyel aktivitenin saptanması amacıyla *Salmonella* Enteritidis (ATTC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATTC 7644), *Staphylococcus aureus* (Cowan suşu), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-253), *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Bacillus subtilis* (Ank. Üniv. Gıda Mühendisliği Bölümü mikrobiyoloji kültür koleksiyonu), *Lactobacillus plantarum* (turşu izolatu suş no 4) ve *L. brevis* (turşu izolatu suş no, 150-a) kullanılmıştır. Bakterilerin geliştirilmesi ve ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin

ölçümü amacıyla *L. plantarum* ve *L. brevis* için De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve MRS agar, diğer tüm bakteriler için ise tryptic soy broth (TSB) ve tryptic soy agar (TSA) besiyerleri kullanılmıştır. Her bir kültürden gerektiğinde FTS ile seyreltme yapılarak yaklaşık olarak 10⁸ KOB/mL bakteri içeren standart inokulum hazırlanmıştır.

Kuyu Difüzyon Testi ile antimikrobiyel aktivite tayini

Liyofilize haldeki nar ekstraktından aseptik koşullarda, steril saf su ile %5 (w/w) stok çözelti hazırlanmış, çözelti 0.45 µm gözenek çapındaki steril membran filtreden (Sartorius) geçirilerek sterilize edilmiştir. Nar ekstraktı stok çözeltisinden steril destile su ile %0.1; %0.2 ve %0.3 (w/v) konsantrasyonlarda nar ekstraktı çözeltileri hazırlanmıştır. Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi için Lenette (28) tarafından önerilen "kuyu difüzyon yöntemi" uygulanmıştır (29). Bu yöntemde hazırlanan inokulumdan, 45°C sıcaklığa soğutulmuş steril 28 mL TSA ve MRS agar besiyerlerine yaklaşık 1.0 x10⁶ KOB/mL bakteri içerecek şekilde %1 oranında ilave edilerek steril cam petrilere (11 cm çap, 1.5 cm derinlik) aktarılmıştır. Besiyerleri ortam sıcaklığında (18±2 °C) 15 dakika süre içinde katılaştıktan sonra, 9 mm çaplı steril metal bir mantar delici kullanılarak aseptik koşullarda her petriye 6 adet kuyucuk açılmıştır. Bu kuyucuklara en az 2 paralel olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki her bir örnekten 0.1 mL aktarılmış ve besiyerleri 35 °C'da 20-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon kuyucuklar etrafında oluşan ve tam berrak olan inhibisyon zonları dikkate alınarak bir kumpasla "mm" olarak ölçülmüş (kuyucuk çapı dâhil) ve antibakteriyel aktivite saptanmıştır.

Köfte Üretimi ve Depolama Şartları

Köfte formülasyonu; %86.75 dana kıyma (%12 yağlı), %6 galeta unu, %0.25 karabiber, %0.5 kimyon, %3.5 soğan, %1.5 tuz, %0.5 sarımsak ve NKE'nin çözünme ortamı olarak %1 su içermiştir. Köfte hazırlama işlemi hijyenik koşullarda ve 4-8 °C'de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan köfte hamuru beş gruba ayrılmıştır; gruplardan biri kontrol (K) olarak ayrılmış, diğer dört gruba sırasıyla %0.01 BHT (w/w), %0.1 (NKE1), %0.2 (NKE2) ve %0.3 (NKE3) (w/w) NKE ilave edilerek ayrı ayrı yoğrulmuş, her grup 20±2 g ağırlığında ve 1 cm kalınlığında şekillendirilmiştir. Kimyasal antioksidan olarak kullanılan BHT, 10 mL etil alkolde (%96'lık) çözündürülerek hamura ilave edilmiştir. Hazırlanan köfteler bekletilmeksizin plastik kaplara tek sıra yerleştirilmiş ve 4±1 °C'de aerob koşullarda 6 gün depolanmıştır. Köfte örneklerinden depolamanın 0., 3. ve 6. günlerinde analiz örnekleri alınmış ve kimyasal, duyuusal ve mikrobiyolojik analizler yürütülmüştür.

Köftede Yapılan Analizler

TBRM değeri

Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (TBARM) değeri, Ahn vd. (30)'nın önerdiği yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Köfte örneğinden 5 g, 15 mL destile su ilave edilerek ultra turrax ile homojenize edilmiştir. Homojenat 2000xg'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatanttan 1 mL vidalı kapaklı cam tüpe alınmış ve üzerine 2 mL TBA-TCA-HCl çözeltisi (%0.375 TBA ayırıcı, %15 TCA ve 0.25 M HCl içeren) ilave edilerek vortex'te (IKA MS3 Basic, Almanya) karıştırılmıştır. Tüpler kapakları kapatılarak kaynar su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiş, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, 2000xg'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki berrak kısmın absorbansı, UV spektrofotometre'de (Labomed UVD-3200) 531 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Örnekteki malondialdehit miktarı, 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak hazırlanan standart kurveden hesaplanmış ve TBARM değeri mg malondialdehit/kg köfte olarak ifade edilmiştir.

Mikrobiyolojik Analiz

Mikrobiyolojik analizlerde 10 g köfte, stomacher torbası içerisinde 90 mL steril peptonlu tuzlu su (%0.1 pepton ve %0.85 NaCl, w/v) içerisinde stomacher'de (Seward 400, Londra, İngiltere), 230 rpm'de 2.5 dakika homojenize edilmiştir. Homejenattan steril peptonlu tuzlu su kullanılarak ardışık seyreltiler hazırlanmış ve AOAC'da (31) belirtilen standart yöntemlere göre Petri kutularına aşağıda belirtilen besiyerlerine dökme yöntemiyle ilave edilerek inkübe edilmiştir. Toplam aerob psikrotrof bakteri (TAPB) sayımı; Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerinde ve 7 °C'de 6-7 gün, toplam aerob mezofil bakteri (TAMB) sayımı; Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerinde ve 28 °C'de 48 saat, toplam Enterobacteriaceae sayımı; Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBDA, Merck) besiyerinde ve 35 °C'de 24 saat, mikrokok-stafilokok sayımı; potasyum-tellurit içeren yumurta sarısı ile hazırlanmış Baird Parker Agar (BPA, Merck) besiyerinde ve 35 °C'de 24-48 saat ve laktik asit bakteri (LAB) sayımı; MRS (Merck) agar besiyerinde 28 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra tipik koloniler sayılarak yapılmıştır. Sonuçlar, log₁₀KOB/g olarak ifade edilmiştir.

Duyusal Değerlendirme

Duyusal değerlendirme, 5 panelist tarafından 6 gün depolama sonunda çiğ örneklerde yapılmıştır. Panelistler köfte örnekleri renk, koku (ransit, kötü ve kokuşma) ve genel beğeni yönlerinden 7 puan üzerinden (7: çok iyi, 1: çok kötü) değerlendirmişlerdir.

İstatistik Analiz

Çalışmada soğukta depolama için köfte etler muamelenin beş seviyesine (K, BHT, NKE1,

NKE2 ve NKE3) ve depolama süresinin seviyelerine (0., 3. ve 6. günler) bağlı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, Minitab® paket programında varyans analizine tabi tutulmuş ve Duncan çoklu karşılaştırma testi (MSTAT) kullanılarak gruplar arası farklılıklar, %1 önem düzeyine göre belirlenmiştir. İstatistik değerlendirme, her bir tekerrürde aynı analiz için belirlenen 2 paralelin ortalaması üzerinden ve 2 tekerrür ortalaması dikkate alınarak yapılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite

Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik madde miktarı kuru ağırlıkta ve gallik asit eşdeğeri olarak 158.5 mg/g bulunmuştur. Bitkisel kaynaklardan fenolik maddelerin ekstraksiyonunda metanol, etil asetat ve etanol gibi çözügenlerin kullanılması ile daha fazla fenolik madde ekstrakte edildiği (20, 23) bildirilmesine karşın, su ile ekstraksiyonda da önemli düzeyde fenolik madde ekstrakte edilmiştir. Fenolik madde içeren ekstraktların gıdalara katılmaları nedeniyle kalıntı çözügen kalma olasılığı ve bunlarında toksik etkileri nedeniyle ekstraksiyonda su kullanımı tercih edilmiştir. Diğer çalışmalarda, nar kabuğu sulu ekstraktında fenolik madde miktarı kateşin eşdeğeri olarak 140 mg/g (20) ve 161.25 mg/g (23) bulunmuş ve çalışmamızda elde edilen sonuca benzer olmuştur. Antioksidan aktivite nar kabuğu ekstraktında 5800.6 mM/g ekstrakt, BHT'de 4193.8 mM/g ekstrakt bulunmuştur. Görüldüğü üzere, nar kabuğu kimyasal antioksidan BHT'den daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Kanatt vd. (2010) da (23), nar kabuğu ekstraktının BHT ve nar danesi ekstraktından daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini, konsantrasyon arttıkça antioksidan etkinin daha da arttığını belirtmişlerdir. Nar kabuğunun antioksidan etkisi yüksek düzeyde içerdiği polifenollerden (kondanse tanenler ve antosiyaninler) kaynaklanmaktadır (15,18).

Nar Kabuğu Ekstraktının Antimikrobiyel Aktivitesi

Nar ekstraktından hazırlanan 3 ardışık konsantrasyondan sadece % 0.2 ve % 0.3'lük konsantrasyonlarının Gram-pozitif bakteri *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkisi olduğu, test edilen diğer bakterilere karşı ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Kanatt vd. (23), NKE'nın %0.01, %0.05 ve %0.1 konsantrasyonlarda Gram-pozitif bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkilerini bildirmişlerdir. Buna karşın %0.01 ve %0.05 konsantrasyonların Gram-negatif bakterilerden *S. typhimurium* ve *E. coli* üzerine etkilerinin olmadığını, sadece %0.1'lik düzeyin *Pseudomonas* spp. üzerine

inhibitör etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Negi ve Jayaprakasha (20) da, NKE'nin *E. coli*'ye karşı etkisinin az olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada literatürden farklı olarak NKE'nin mikroorganizmalar üzerine olan antimikrobiyel etkilerindeki farklılıkların kullanılan mikroorganizma suşu, ekstraksiyon yöntemi ve çözeltisi (su, etil alkol vd.) ve uygulanan konsantrasyon gibi farklılıklardan ileri gelmiş olduğu düşünülmektedir. Negi ve Jayaprakasha (20), nar kabuğunun aseton ve metanol ekstraktlarının en iyi antibakteriyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Nar kabuğu ellajik asit, ellagitanen, gallik asit (32) ve diğer fenolik bileşikler (33) içermektedir ve bu bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteden sorumlu oldukları bilinmektedir (34). Tanenler, bakteri hücre duvarı proteinleri ile kompleks yaparak bu şekilde hücre geçirgenliğini ve hücreye substrat geçişini azaltarak, (2) bazı önemli bakteriyel enzimleri inhibe ederek (3), metal iyonlarıyla stabil kompleksler yaparak, bunların bakteriler tarafından kullanımını engelleyerek antimikrobiyel etkilerini göstermektedirler (34).

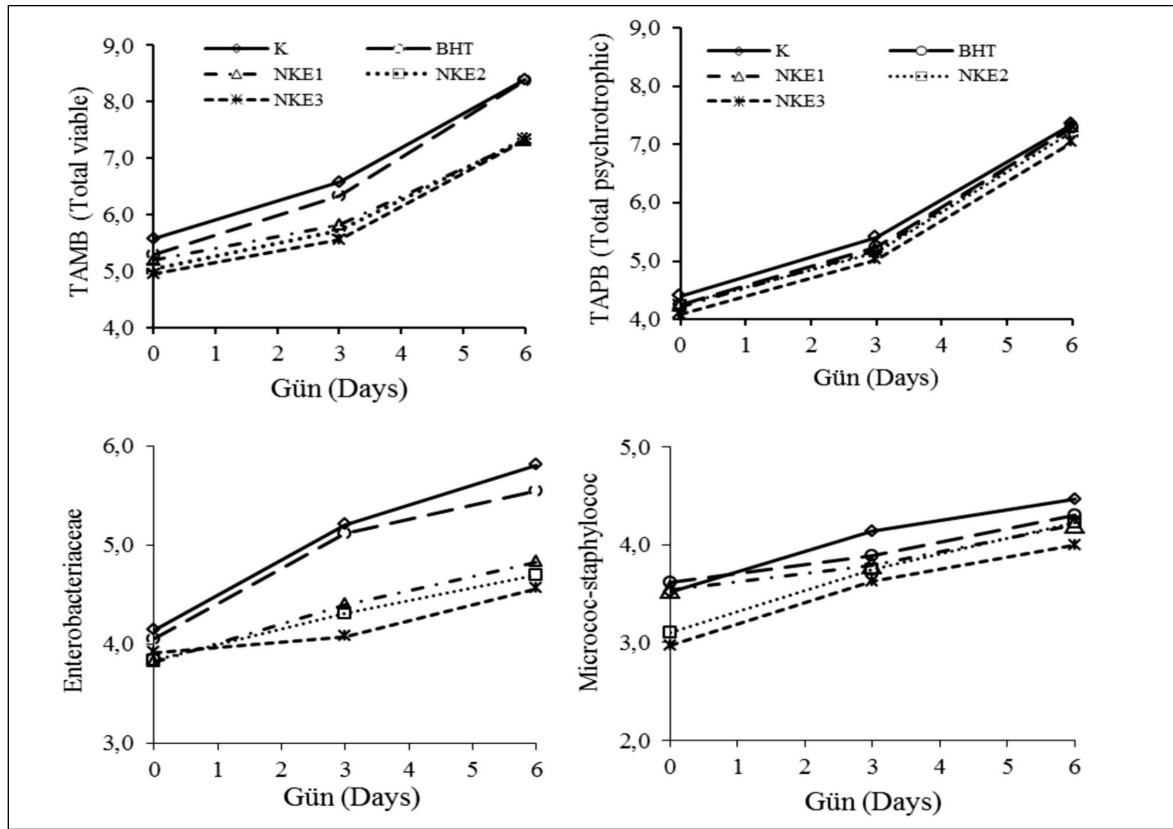
Nar Kabuğu Ekstraktının Antibakteriyel Etkisi

Farklı düzeylerde NKE ilavesinin köftelerin soğukta depolanması sırasında TAMB, TAPB, Enterobacteriaceae ve mikrokok-stafilokok sayılarına etkileri Şekil 1'de görülmektedir. Köfte örneklerin başlangıç TAMB ve TAPB sayıları sırasıyla 4.95-5.58 log₁₀KOB/g ve 4.09-4.40 log₁₀KOB/g arasında değişmiş, en yüksek sayı depolama boyunca antioksidan kaynağı içermeyen K örneklerde tesbit edilmiştir. Her üç düzeyde NKE ilavesi K örnekleriyle kıyaslandığında TAMB çoğalmasını önemli düzeyde engellemiş ($P<0.01$), daha az TAMB sayısı içeren bu örneklerle K ve BHT içeren örneklerin TAMB sayıları arasındaki fark önemli olmuştur ($P<0.01$). Depolamanın 3. ve 6. günlerinde NKE ilavesi, K örneklerle karşılaştırıldığında TAMB çoğalmasını inhibe etmiş ve bunların sayısında yaklaşık 1 log düzeyinde fark yaratmıştır ($P<0.01$). TAPB sayısındaki artış ise, farklı düzeylerde NKE ilavesi ile çok az düzeyde baskılanmıştır ($P<0.01$). İstatistiksel olarak önemli görünse de, NKE3 katılan örneklerin TAPB sayılarında 3. ve 6. günlerde 0.3 log'dan daha az, yani dikkate alınmayacak bir azalmanın olduğu görülmüştür. NKE ilavesi depolama sırasında toplam Enterobacteriaceae sayısındaki artışı önemli düzeyde baskılamış ($P<0.01$) ve bu etki depolama boyunca görülmüştür. NKE konsantrasyonu %0.1'den %0.3'e arttıkça bu örneklerde toplam Enterobacteriaceae sayısı azalmıştır. Bu örneklerde, K örneği ile kıyaslandığında 6 günlük depolama sonunda toplam Enterobacteriaceae yükünde görülen azalmaların BHT, NKE1, NKE2 ve NKE3

için sırasıyla 0.26; 0.98; 1.11 ve 1.25 log ($P<0.01$) düzeyinde olduğu saptanmıştır. Köfte örneklerinin mikrokok-stafilokok sayıları NKE ilavesi ve artan konsantrasyonla önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.01$). Köfte örneklerinde Laktik asit bakterisi (LAB) sayımları (şekil verilmemiştir) depolama başlangıcında 3.85-3.99 log₁₀KOB/g arasında değişmiş, depolama süresi boyunca LAB yükü tüm örneklerde paralel olarak artarak 6.65-6.67 log₁₀KOB/g arasında değişmiştir. Ancak BHT ve NKE ekstraktlarının LAB sayısı üzerinde önemli düzeyde bir etkisi olmamıştır ($P>0.01$). Sağdıc vd. (35), farklı üzüm çeşitlerinden elde edilen üzüm posası ekstraktlarını farklı konsantrasyonlarda (%1; %2; %5 ve %10) ilave ettikleri kıyma örneklerin soğukta 48 saat depolanması sırasında, ekstrakt konsantrasyonu arttıkça patojen ve bozulma yapan mikroorganizma sayılarının azaldığını belirlemişlerdir. Kıyma, köfte tipi ürünlerde bozulma sınırı 10⁶-10⁷ KOB/g'dır (36). Buna göre, ilk üç gün K dâhil tüm örnekler bu sınırların altında kalmıştır. Fakat depolamanın 6. gününde hem TAMB hem TAPB sayıları tüm örneklerde 10⁷ KOB/g sınırındadır. TAMB ve TPAB sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, K ve BHT'li örneklerin 4. günde, %0.1 ve %0.2 NKE'li örneklerin 5. günde, %0.3 NKE'li örneklerin ise 6. günde bozulma sınırlarına ulaştıklarını göstermektedir. Doğal ekstraktlar gıda sistemlerine dâhil edildiklerinde antimikrobiyel etkilerinin azaldığı bildirilmiştir (37). Bu çalışmada ise, NKE test edilen bakterilerden sadece birine karşı etkili olmuş, köfteye ilave edildikten sonra depolama süresince mikrobiyel sayım sonuçları dikkate alındığında, kullanılan ekstrakt konsantrasyonlarının K örnekleriyle kıyaslandığında TAMB sayısında ve toplam Enterobacteriaceae sayısında depolamanın 6. gününde ortalama 1 log düzeyinde bir fark yarattığı ve sonuçta seçilen konsantrasyonların düşük düzeyde etkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda NKE'nin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması ve test edilmesini önermekteyiz.

Nar Kabuğu Ekstraktının Antioksidan Etkisi

Soğukta depolanan köftelerdeki lipid oksidasyonuna farklı NKE konsantrasyonlarının etkisi Şekil 2'de görülmektedir. TBARM için yapılan varyans analizi sonuçları hem depolama süresinin hem de antioksidan kaynağı ilavesinin ve konsantrasyonun önemli etkisi olduğunu göstermiştir ($P<0.01$). NKE etkisi 0. günde görülmüş ve K örnekler 1.02 mg MDA/kg ile en yüksek değere, NKE'li örnekler 0.66-0.76 mg MDA/kg arasında en düşük değerlere sahip olmuşlardır. Depolamanın her döneminde en fazla TBARM miktarı K örneklerde bulunmuş ve 6. günde 1.34 mg MDA/kg değerine ulaşmıştır.



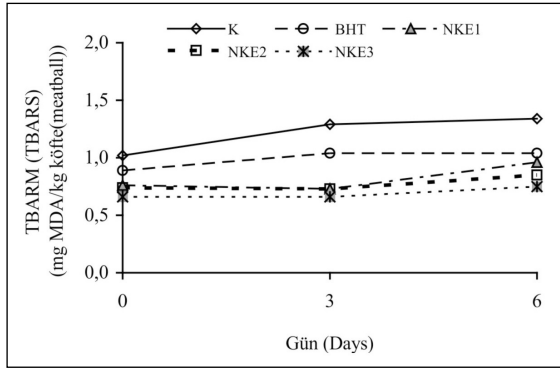
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda NKE ilavesinin köftelerin soğukta depolanması sırasında mikrobiyel yüküne etkisi
Figure 1. Effect of PE addition at various concentrations on microbial load (log10CFU/g) of meatballs during refrigerated storage

NKE konsantrasyonunun etkisi depolanmanın 3. ve 6. günlerinde %0.3 NKE içeren örnekler ile %0.2 ve %0.1 NKE içeren örnekler arasında önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Depolanmanın 6. gününde en düşük TBARM düzeyi 0.75 mg MDA/kg ile NKE3 örneklerinde saptanmıştır. Depolama boyunca en fazla artış %31 ile K örneklerde olurken, en az artış %13 ile %0.3 NKE içeren örneklerde meydana gelmiştir. Köftede TBARM oluşumunu antioksidan kaynakları (BHT ve NKE) önemli düzeyde azaltmaktadır. Bu sonuçlar fenolik asitler, flavonoidler, proantosiyandinler ve hidrolize tanenleri önemli düzeylerde içeren NKE'nin antioksidan kaynağı olarak kıyma etlerde kullanılabileceğini göstermiştir. Nar kabuğunda bulunan fenolik bileşiklerin lipid oksidasyonunu inhibe ettiği diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir. Fenolik bileşiklerin serbest radikal oluşumunu ve serbest radikallerin demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile kelat yaparak serbest radikal reaksiyonlarının başlamasını engellediği belirtilmektedir (37,38). Shan vd. (4), oda sıcaklığında (20°C'de) 9 gün depoladıkları parça domuz etlerinin karanfil, nar kabuğu, üzüm çekirdeği gibi doğal ekstraktlarla muamele edilmesinin TBARM oluşumunu önemli düzeyde

azalttığını, 9. günde TBARM miktarlarının doğal ekstraktlarla muamele edilen örneklerde 0.8-0.9 mg MDA/kg aralığında, K örneklerinde ise 2.1 mg MDA/kg bulmuşlardır. Çalışmamızdaki TBARM değerlerinin bu araştırmadaki değerlerden daha düşük olma nedeni, depolama sıcaklıkları arasındaki farktan ve çalışılan et türünün farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Nar Kabuğu Ekstraktının Köftenin Duyusal Özelliklerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda NKE içeren köftelerin 6 gün 4°C'de depolanması sonrası yapılan duyusal değerlendirme sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Ransit koku yönünden uygulamalar arasında BHT dışında önemli bir farklılık algılanmamıştır. Kötü koku yönünden panelistler 6. günde K, BHT ve %0.1 NKE içeren örneklerle en düşük puanları vermiş (ortalama 3.5), en yüksek puan %0.3 NKE içeren örneklere (5.30) verilmiştir. Buradan, soğukta depolanmış köftelere yüksek konsantrasyonlarda NKE ilavesinin kötü koku oluşumunu önemli düzeyde azalttığı görülmektedir ($P < 0.01$). Kokuşma kokusu yönünden, K örneklerin en düşük puanı aldığı (3.5) ve diğer örneklerle aralarında önemli farklılık olduğu ($P < 0.01$), yani kokuşma kokusunun 6. günde hissedildiği anlaşılmaktadır. TAMB ve



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda NKE ilavesinin köftelerin soğukta depolanması sırasında lipid oksidasyonuna (TBARS) etkisi

Figure 2. Effect of PE addition at various concentrations on lipid oxidation (TBARS) of meatballs during refrigerated storage

TAPB sonuçları ile karşılaştırıldığında K örnekleri 6. günde 7 log sınırını aşmış ve bozulma duyuşal olarak da algılanabilmiştir. Genel beğeni puanları incelendiğinde en düşük puan ortalaması, yani en az beğenilen örnekler K (3.50), BHT (3.90) ve NKE1 (3.70) olmuş ve aralarındaki fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.01$). Yüksek konsantrasyonda NKE içeren örneklerin (%0.2 ve %0.3) TAMB ve TPAB sayıları 6. günde 7 log düzeyinin üzerinde olmasına karşın kötü koku ve kokuşma kokusu ve genel beğeni yönlerinden iyi puanlar alması, 7 log düzeyinde bu özelliklerin duyuşal olarak algılanamadığını düşündürmektedir. Buna karşın log 8 düzeyinde kötü koku ve kokuşma kokusu panelistlerce algılanmıştır.

SONUÇ

Çiğ et ürünleri kısa raf ömrüne sahiptir. Raf ömrünü kısaltan başlıca faktörler ise etin ve formülasyona giren katkı maddelerinin başlangıç mikrobiyel kalitesi, proses sırasındaki mikrobiyel kontaminasyon ve sıcaklıktır. Nar kabuğu ekstraktı köfte tipi et ürünlerine ilave edilerek 4 °C'de depolama ömrü 4-5 güne çıkarılabilmektedir. Çalışmada ilave edilen düzeylerde (%0.1; %0.2 ve %0.3) depolama süresinde sağlanan sınırlı düzeydeki artış, yüksek konsantrasyonlar ilave edilerek daha da artırılabilir. Burada ürünün duyuşal

özelliklerini değiştirmeyecek düzeylerin belirlenmesi önemlidir.

Teşekkür

Bu çalışma, Hazret Özdemir'in Yüksek Lisans Tezi'nin bir kısmından üretilmiş ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından (proje no: 12B4343009) desteklenmiştir. Çalışma bulgularının istatistik analizlerini yapan Berna Özalp Özen'e ve Laktik asit bakterisi türşu izolatlarını veren Prof. Dr. Filiz Özçelik'e ve Dr. Mehmet Tokatlı'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. 1991. Shelf life extension and microbial safety of fresh meat – A Review. *Food Microbiol*, 8, 267-297.
- Fernández J, Perez-Alvarez JA, Fernández-López JA. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem*, 59, 345-353.
- Fernández-López J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Pérez-Alvarez, JA, Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Sci*, 69, 371-380.
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. 2009. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservative of raw pork. *J Sci Food Agric*, 89, 1879-1885.
- Anon. 2013. Spoilage of Food Products-Meat and Meat Products (Chapter 4), Lectures of Ghent University. Department of Food Safety and Food Quality. <http://pathogencombat.wur.nl> (Erişim tarihi 01.03.2014).
- Dainty RH, Mackey BM. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J Appl Bacteriol* (Supplement), 73(S), 103-114.
- Varnam AH, Sutherland JP. 1995. *Meat and Meat Products*. Chapman and Hall, London.
- Decker EA, Xiong YL, Calvert JT, Crum AD, Blanchard SP. 1993. Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem*, 41, 186-189.
- Shahidi F. 1997. Natural Antioxidants An Overview. In: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*, Shaihi, F (Ed), AOCS Press, Illinois, pp. 1-11.

Çizelge 1. NKE içeren köftelerin 4±1 °C'de 6 gün depolama sonrası duyuşal değerlendirme sonuçları
Table 1. Sensory evaluation scores of PE treated raw meatballs after 6 days of storage at 4±1 °C

| Uygulama Treatment | Ransit koku Rancid odor | Kötü koku Off-odor | Kokuşma kokusu Putrefactive odor | Genel beğeni General acceptability |
|-----------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| K | 5.00±0.00 ^a | 3.50±0.14 ^c | 3.50±0.14 ^c | 3.50±0.14 ^b |
| BHT | 4.70±0.14 ^b | 3.50±0.14 ^c | 4.10±0.14 ^b | 3.90±0.14 ^b |
| NKE1 | 5.00±0.00 ^a | 3.50±0.14 ^c | 4.00±0.00 ^b | 3.70±0.14 ^b |
| NKE2 | 4.90±0.14 ^a | 4.70±0.14 ^b | 5.10±0.14 ^a | 5.15±0.21 ^a |
| NKE3 | 5.10±0.14 ^a | 5.30±0.07 ^a | 5.35±0.07 ^a | 5.45±0.21 ^a |

a,b,c: Her bir sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.01$).

a,b,c: Different letters indicate significant difference ($P<0.01$) in each column.

10. Soyer A, Şahin ME. 1999. Effect of glazing and storage time on lipid oxidation of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Turk J Vet Anim Sci*, 23, 575-584.
11. Wu JM, Lee MH, Ho CT, Chang SS. 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J Am Oil Chem So*, 59(8), 339-345.
12. Lindberg Madson H, Bertelsen G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci Tech*, 6, 271-278.
13. Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 99, 191-203.
14. Vuorela S, Salminen H, Makeda M, Kivikari R, Karonen M, Heinonen M. 2005. Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *J Agric Food Chem*, 53, 8492-8497.
15. Wang R, Ding Yi, Liu R, Xiang L, Du L. 2010. Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit Veg Cereal Sci Biotech*, 4(2),77-87.
16. Tomas-Barberan F, Espin JC. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruit and vegetables. *J Sci Food Agric*, 81, 853-876.
17. Guo, C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res*, 23, 1719-1726.
18. Wang Z, Pan Z, Ma H, Atungulu GG. 2011. Extract of phenolic from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal*, 5, 17-25.
19. Li Y, Gou C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*, 96, 254-260.
20. Negi PS, Jayaprakasha GK. 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci*, 68(4), 1473-1477.
21. Nuamsetti T, Dechayuenyong P, Tantipaibulvut S. 2012. Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *ScienceAsia*, 38, 219-322.
22. Naveena BM, Sen AR, Kingsly RP, Singh DB, Kondaiah N. 2008. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *Int J Food Sci Technol*, 43, 1807-1812.
23. Kanatt SR, Chander R, Sharma A. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Int J Food Sci Technol*, 45, 216-222.
24. Hayrapetyan H, Hazeleger WC, Beumer RR. 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23, 66-72.
25. Qin YY, Zhang ZH, Li L, Xiong W, Shi JY, Zhao TR, Fan J. 2013. Antioxidant effect of pomegranate rind powder extract, pomegranate juice, and pomegranate seed powder extract as antioxidants in raw ground pork meat. *Food Sci Biotechnol*, 22(4), 1063-1069.
26. Singleton VL, Rossi JA Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16, 144-158.
27. Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A. 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chem Toxicol*, 39, 787-791.
28. Lenette EH. 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd ed, American Society for Microbiology.
29. Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos JM. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicines for the treatment of gastrointestinal disorder. *J Ethnopharmacol*, 100, 153-157.
30. Ahn D U, Olson D G, Jo C, Chen X, Wu C, Lee J I. 1998. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties. *Meat Sci*, 47, 1, 27-39.
31. Anon 1998. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed, A.O.A.C. International, Gaithersburg, MD.
32. Ozkal N, Dinc S. 1994. Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. *Ank Üniv Ecz Fak Dergisi*, 22, 21-29.
33. Nasr CB, Ayed N, Metche M. 1996. Quantitative determination of the phenolic content of pomegranate peel. *Z LebensmUnters Forsch*, 203, 374-378.
34. Chidambaramurty KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. 2002. Antioxidant activity of pomegranate peel extracts in vivo models. *J Agric Food Chem*, 50, 4791-4795.
35. Sagdic O, Ozturk I, Yilmaz MT, Yetim H. 2011. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *J Food Sci*, 76(7), M515-M521.
36. ICMSF. 1986. Microorganisms in foods.2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications (2nd ed.), Toronto: University of Toronto Press.
37. Ahn J, Grün IU, Mustapha A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol*, 24, 7-14.
38. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rica-Evans CA. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu⁺² ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J*, 330,1173-1178.