



## Et Ürünlerinde Hidroksiprolin Miktarının Belirlenmesinde Mikrodalga ile Protein Hidrolizi Yönteminin Araştırılması

### An Investigation of Microwave Protein Hydrolysis for Determination of Hydroxyproline in Meat and Meat Products

Tuğba GEZGİN<sup>1</sup>, Sümeyye KARAKUŞ<sup>2</sup>, Hüseyin BÜLBÜL<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dr, Tarım ve Orman Bakanlığı Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü / KONYA, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0002-9119-5063

<sup>2</sup> Vet. Hek., Tarım ve Orman Bakanlığı Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü / KONYA, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Ziraat Yük. Müh., Tarım ve Orman Bakanlığı Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü / KONYA, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 27.08.2019

Kabul Tarihi : 28.11.2019

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, et ve et ürünlerinde hidroksiprolin tayini için mikrodalga kapalı yakma sistemiyle protein hidrolizi araştırılmış ve sonuçlar standart hidroliz yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Bu amaçla, 36 adet et ürünü örneği (sucuk, salam, köfte, döner, hamburger) 6 M HCl ile mikrodalga kapalı yakma sisteminde basınç kontrollü veya sıcaklık kontrollü olarak iki farklı programda hidroliz edilmiş, elde edilen hidrolizatlar NMKL-AOAC (Anonim 1990) metodunda olduğu gibi spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir.

**Bulgular ve Sonuç:** Ölçüm sonuçları, standart hidroliz sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Et ve et ürünlerinde hidroksiprolin tayini için mikrodalga (basınç kontrollü veya sıcaklık kontrollü) ile protein hidroliz işlemi standart hidrolize göre çok daha kısa sürede (yaklaşık 30 dk.) tamamlanmış, istatistiki test sonuçlarına göre, mikrodalga hidroliz yöntemi sonuçları, standart hidroliz yöntemi sonuçları ile yüksek korelasyon göstermiş ( $r^2=0,99$ ) ve %99,9 güven aralığında sonuçla arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hidroksiprolin, Mikrodalga, Hidroliz, Salam

#### Abstract

**Objective:** In this study, protein hydrolysis by microwave digestion system for determination of hydroxyproline was investigated and results were compared with standard hydrolysis.

**Materials and Methods:** For this purpose 36 meat samples in different types (sucuk, salami, doner, meatball, hamburger) were hydrolysed with 6 M HCl by Microwave at two different programmes as temperature controlled or pressure controlled and obtained hydrolyzates were analysed as in NMKL-AOAC (Anonim 1990), spectrophotometrically.

**Results and Conclusion:** Results of measurements were compared with results of standart method, statistically. Protein hydrolysis for determination of hydroxyproline in meat and meat products was completed in a very shorter time (about 30 min.) by microwave (temperature controlled or pressure controlled) and according to the results of statistical tests, the results of microwave hydrolyse has shown high correlation ( $r^2=0,99$ ) with the results of standart hydrolyse and it was found no significant difference between the results of microwave hydrolysis and standard hydrolyse at 99,9% confidence level.

**Key Words:** Hydroxyproline, Microwave, Hydrolysis, Salami

## 1.Giriş

Et ve et ürünlerinin protein kalitesi, bağ doku proteinlerinin miktarıyla ilişkilidir (Zarkadas ve ark. 1988). Düşük et kalitesi (hem besinsel hem de tekstürel açıdan) hem sindirebilirliğinin düşük olması hem de esansiyel aminoasitleri içermemesi nedeniyle bağ dokusu miktarının yüksek olduğu bir et bileşimini ifade eder (Laakkonen ve ark. 1970). Hidroksiprolin tayini, et ve et ürünlerinde bağ doku miktarının belirlenmesinde kullanılan analizdir. Hidroksiprolin aminoasiti bağ dokunun yapısını oluşturan kolajen proteinine özgü ve kasın fibriller protein yapısında bulunmayan bir aminoasittir (Young ve Pellet 1984). Et ve et ürünlerinde hidroksiprolin miktarının belirlenmesinde standart NMKL-AOAC (Anonim 1990) spektrofotometrik metodu en yaygın kullanılan metottur. Metot prosedüründe protein hidrolizi 7 N sülfürik asit ile 105°C'de 16 saatte gerçekleştirilmektedir. Bu hidroliz işlemi hem uzun sürmekte hem de sonrasında numunelerin süzülmesi ve seyreltilmesi işlemleri yoğun iş gücü gerektirmektedir. Hidroksiprolin aminoasidinin geleneksel hidroliz yöntemi ise 6 M HCl ile 24 saat olarak bilinmektedir (Moore ve ark. 1958).

Mikrodalga ile protein hidrolizi ilk defa Chen ve ark. (1987) tarafından ticari mikrodalga ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Gilmann ve Woodward (1989), örnek miktarı düşük olduğu durumlar için gaz fazı mikrodalga hidroliz yöntemini önermişlerdir. Et ve et ürünlerinde hidroksiprolin tayininde Mikrodalga hidroliz yöntemi, ilk defa İsviçre Et Enstitüsü'nde (Swedish Meat Research Institute, Kavlinge, Sweden) Kolar ve Berg (1990), 30 farklı et örneğini, 2 gr numune ve 15 mL 6M HCl kullanarak basınç kontrollü ve basınç kontrolsüz olarak 2 farklı yöntemle mikrodalga ile hidroliz ederek, standart metot (Anonim 1990) ile karşılaştırmış, mikrodalga ile protein hidrolizi ile standart metot kadar doğru ve kesin sonuçlar elde edildiğini belirtmişlerdir. Marconi ve ark. (1995), peynir ve buğday örneklerini mikrodalga ile basınç kontrollü olarak 100 psi basınçla hidroliz ederek aminoasit bileşimlerini analiz etmişler, mikrodalga kullanılarak hidroliz ile tutarlı ve tekrar edilebilir sonuçlar elde edildiğini, özellikle kromatografik çalışmalarda kontaminasyon ve operatör hatalarının minimize edildiğini belirtmişlerdir. Messia ve ark. (2008), et bazlı gıda ürünlerinde 4-hidroksiprolin miktarının tespiti için basınç ve sıcaklık kontrollü olarak 100-130 psi basınç altında 100-155°C'de gerçekleştirdikleri mikrodalga hidroliz yöntemiyle geleneksel hidroliz (etüv'de 110°C'de 24 saat) yöntemini karşılaştırarak iki hidroliz yöntemi arasında istatistiki olarak önemli derecede fark olmadığını belirtmişlerdir.

Mikrodalga kapalı yakma sistemi, mikrodalga ışınlarının salınımıyla elektriksel alan ve manyetik alanın etkisiyle oluşan elektromanyetik radyasyonun

enerjisiyle moleküllerin ısınmasını sağlayan bir teknolojidir (Engelhart 1990). Mikrodalga kapalı yakma sisteminde kullanılan elektromanyetik güç, gücün uygulandığı süre, gücün dağılım yaptığı numunenin cinsi ve miktarı, numunenin hidrolizi için kullanılan asit miktarı gibi faktörler hidroliz işlemi üzerine önemli derecede etkilidir.

Bu çalışmada et ve et ürünlerinde hidroksiprolinin spektrofotometrik tayini için gerçekleştirilen protein hidrolizi aşaması mikrodalga kapalı yakma sistemi ile basınç kontrollü veya sıcaklık kontrollü olarak iki farklı yöntemle gerçekleştirilerek, elde edilen hidrolizatlar spektrofotometrede okunarak, standart metot (Anonim 1990) ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

5 farklı et ürünü örneği (sucuk, salam, döner, hamburger ve köfte) ve 1 adet referans malzeme (FAPAS TET018-RM) 3 paralelli ve farklı zamanlarda 2 tekerrür olarak analiz edilmiş, 6x3x2=36 adet örnek mikrodalga ile basınç kontrollü veya sıcaklık kontrollü olarak iki farklı programda, aynı zamanda standart NMKL-AOAC (Anonim 1990) metoduna göre 3 farklı şekilde hidroliz edilmiştir.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Standart Hidroliz

Standart hidroliz işlemi, NMKL-AOAC (Anonim 1990) metoduna göre yapılmıştır. 4 gr et örneği 7 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile etüvde 105°C'de 16 saat hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizatlar sıcakken Whatman No:1 filtre kağıdından 500 mL'lik balon jodelere süzümüştür. Çizgisine kadar su ile tamamlanarak elde edilen filtratlar, +4°C'de saklanmıştır.

#### 2.2.2. Mikrodalga ile Hidroliz

Mikrodalga hidroliz işlemi, MarsXpress Mikrodalga (CEM, 2011) cihazında gerçekleştirilmiştir.

##### 2.2.2.1. Basınç Kontrollü Mikrodalga Programı

Kolar ve Berg (1990) metoduna göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. 0,4 gr et örneği 50 mL kapasiteli Teflon PFA mikrodalga vesselere tartıldıktan sonra üzerine 8 mL 6 M HCl ilave edilerek kapakları sıkıca kapatılmıştır. Örnekler mikrodalga kapalı yakma sisteminde basınç kontrollü program ile 100 psi basınç altında Çizelge 1.'de yer alan programa göre iki aşamalı olarak hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra vesseler el değme sıcaklığına soğutulmuş ve hidrolizatlar sıcak halde Whatman No:1 filtre kağıdından 50 mL'lik balonlara süzülerek çizgisine su ile tamamlanmıştır. Elde edilen hidrolizatlar +4°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 1.** Basınç kontrollü mikrodalga hidroliz programı

|                              | 1.aşama | 2.aşama |
|------------------------------|---------|---------|
| <b>Power (% , 800 W)</b>     | 100     | 80      |
| <b>Hidroliz süresi (dk.)</b> | 10      | 10      |
| <b>Basınç (max,psi)</b>      | 90      | 100     |

**2.2.2.2.Sıcaklık Kontrollü Mikrodalga Programı**

Messia ve ark. (2008)'in metoduna göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. 0,4 gr et örneği Xpress tip 110 mL kapasiteli vessellere tartılmış ve üzerine 8 mL 6 M HCl ilave edilerek ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra mikrodalga kapalı yakma sisteminde sıcaklık kontrollü program seçilerek Çizelge 2'de belirtilen programa göre her hidrolizde 12 adet vessel kullanılarak iki aşamalı program ile hidroliz edilmiştir. Hidrolizde kullanılacak örnek sayısı 12'den az olduğu zaman diğer vesseller aynı miktarda asit ile doldurularak vessel sayısı 12'ye tamamlanmış, hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra vesseller el değme sıcaklığına kadar soğutulmuş, hidrolizatlar sıcak halde Whatman No:1 filtre kağıdından 50 mL'lik balonlara süzülerek çizgisine su ile tamamlanmıştır. Elde edilen hidrolizatlar +4°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 2.** Sıcaklık kontrollü mikrodalga hidroliz programı

|                           | 1.aşama | 2.aşama |
|---------------------------|---------|---------|
| <b>Power (% , 800 W)</b>  | 100     | 80      |
| <b>Çıkış süresi (dk.)</b> | 05      | 05      |
| <b>Kalma süresi (dk.)</b> | 20      | 10      |
| <b>Sıcaklık (max,°C)</b>  | 100     | 155     |

**2.2.3.Spektrofotometrede Okuma İşlemi**

Elde edilen hidrolizatlara, NMKL-AOAC (Anonim 1990) metodunun G. bölümünden itibaren aynı işlemler uygulanmış içeriğindeki hidroksiprolin miktarına göre 100 mL'lik balonlara 05-20 mL alınarak seyreltilen örnekler, başka bir tüpe 2mL alınarak üzerine Kloramin-T Oksidasyon solüsyonu ilave edildi. Standartlar (0,6, 1,2, 1,8, 2,4 µg/mL hidroksiprolin) da aynı şekilde 2 mL bir tüpe alınarak 1 mL oksidasyon solüsyonu ilave edilmiştir. Standartlar ve örnekler karanlık bir yerde 20 dk. bekletilerek üzerlerine 1 mL DMAB renk solüsyonu ilave edilmiş 15 dk. 60°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Renk dönüşümü sağlanan standartlar ve örnekler spektrofotometrede 560±2 nm'de 4 noktalı kalibrasyon eğrisiyle okuma yapılmıştır.

Mikrodalga ile hidroliz edilen örnekler için sonuç hesaplama:

$$\text{Hidroksiprolin g/100 g} = \frac{\text{Okunan değer} \times 0,25}{\text{Numune mik}(\text{gr}) \times S^*(\text{mL})}$$

NMKL-AOAC metodu'na göre hesaplama:

$$\text{Hidroksiprolin g/100 g} = \frac{\text{Okuma değeri} \times 2,5}{\text{Numune mik}(\text{gr}) \times S^*(\text{mL})}$$

\*S: Seyreltme işleminde 100 mL'lik balona alınan hidrolizat hacmi (mL).

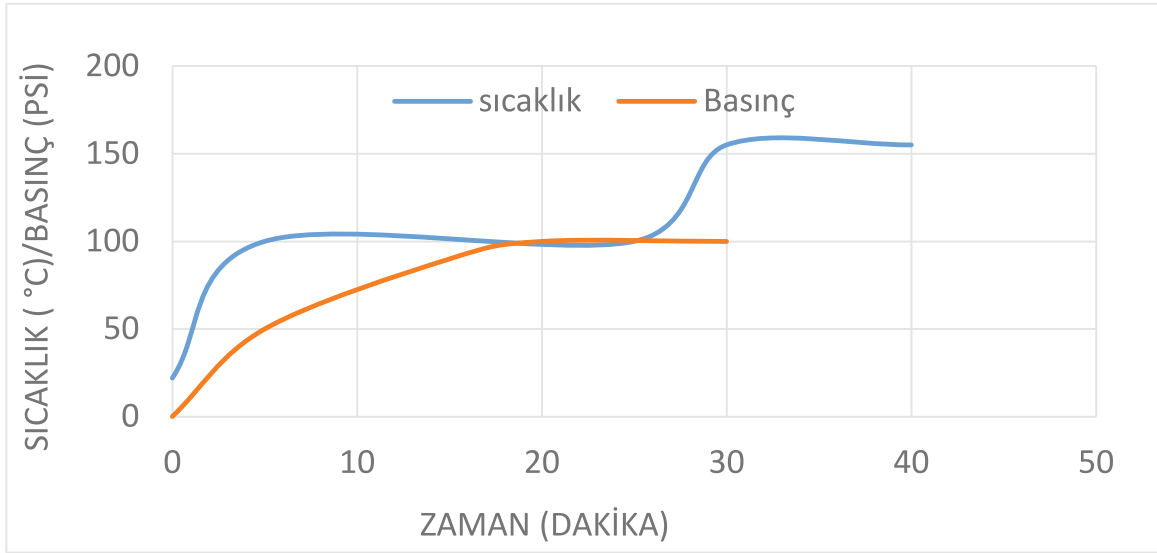
**2.2.4.İstatistiki Analiz**

Mikrodalga ile basınç kontrollü veya sıcak kontrollü olarak hidrolize edilen örneklerin spektrofotometre'de elde edilen ölçüm sonuçları ile Standart hidroliz ile spektrofotometrede elde edilen ölçüm sonuçları student-t test (bağımsız iki örnek) testine tabi tutulmuştur (Microsoft Office Excel 2013). Aynı zamanda regresyon analizi yapılarak iki hidroliz yöntemi arasındaki korelasyon gösterilmiştir.

**3.Tartışma ve Sonuç**

Salam numunesinin basınç kontrollü mikrodalga ile hidroliz (P-MD)'ine ait basınç-zaman grafiği ve sıcaklık kontrollü mikrodalga ile hidroliz (T-MD)'ine ait sıcaklık-zaman grafiği Şekil 1.'de verilmiştir. Basınç kontrollü mikrodalga ile hidroliz ile hidroliz aşamasının ilk 10 dakikasında basınç 100 psi'a ulaşmakta, bu aşamadan sonra Çizelge 1.'deki gibi uygulanan gücün yüzdesi düşürülerek basıncın sabit kalması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra basınçta hafif iniş çıkışlar gözlemlenmiştir. Sıcaklık kontrollü mikrodalga hidroliz programında ise ilk 5 dakikada sıcaklık 100°C'ye ulaşmış, daha sonra 20 dakika boyunca 100°C'de sabit tutulmuştur. Programın ikinci aşamasında uygulanan gücün yüzdesi düşürülerek sıcaklık kontrolü daha yüksek bir sıcaklığa getirilerek bu sıcaklıkta 10 dakika daha mikrodalga uygulanmıştır.

Sıcaklık kontrollü mikrodalga hidroliz programının, basınç kontrollü mikrodalga hidroliz programına göre 20 dk. daha uzun sürdüğü görülmektedir. Sıcaklık kontrollü hidroliz programında basınç faktörünün düşük seviyelerde kalması ve hidrolizi sınırlayan tek faktörün sıcaklık oluşu hidrolizin daha uzun sürmesine neden olmaktadır. Sıcaklık kontrollü mikrodalga hidroliz programında kullanılan vessel tiplerinin ve hacimsel büyüklüklerinin farklı olması da hidroliz süresini etkileyen diğer faktörlerdir.



Şekil 1. Salam numunesinin mikrodalga ile hidrolizine ait Basınç/Sıcaklık- Zaman grafiği

Messia ve ark. (2008)'ın et bazlı ürünlerde hidroksiprolin değerinin belirlenmesi amacıyla yapmış oldukları çalışmada basınç ve sıcaklık kontrollü olarak gerçekleştirdikleri hidroliz işlemi için iki aşamalı programda toplam 6 dk.'nın yeterli geldiğini göstermişlerdir. Marconi ve ark. (1995) farklı gıda örneklerinde aminoasit analizi amacıyla 100 psi basınç altında iki aşamalı olarak toplam 20 dk.'da hidroliz işlemi gerçekleştirmişlerdir. Kolar ve Berg (1990), 2 gr et örneğinde 15 mL 6 M HCl ile 3 aşamalı hidroliz programıyla basınç kontrollü veya kontrolsüz olarak toplam 30 dk.'da hidroliz işlemi tamamladıklarını göstermişlerdir. Çalışmamızda elde

edilen hidroliz sürelerinin bahsedilen kaynaklardan farklı olmasında; alınan örnek ve asit miktarlarının, kullanılan mikrodalga cihazlarının, cihaz etkinliğinin, hidroliz programlarının ve vessel tiplerinin farklı olması gibi nedenler etkili olmaktadır.

6 farklı çeşit et ürününden (salam, sucuk, döner, köfte, hamburger, FAPAS TET018 RM) 36 adet örneğin basınç kontrollü mikrodalga ile hidroliz (P-MD), sıcaklık kontrollü mikrodalga ile hidroliz (T-MD) ve standart metod NMKL-AOAC (Anonim 1990) ile elde edilen hidroksiprolin (g/100 gr) değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırmaları Çizelge 3.'de verilmiştir.

Çizelge 3. Basınç Kontrollü Mikrodalga hidroliz (PMD), Sıcaklık Kontrollü Mikrodalga hidroliz (TMD) ve Standart Hidroliz (SH) ile elde edilen hidroksiprolin (g/100 g) değerlerine ait istatistiksel test sonuçları

|                               | n  | Hidroksiprolin (g/100 gr) |                 |             | t-test** |        |
|-------------------------------|----|---------------------------|-----------------|-------------|----------|--------|
|                               |    | PMD                       | TMD             | SH          | PMD-SH   | TMD-SH |
| Salam                         | 6  | 0,157±0,005               | 0,152±0,005     | 0,156±0,005 | 0,76     | 0,24   |
| Sucuk                         | 6  | 0,256±0,004               | 0,256±0,004     | 0,257±0,004 | 0,44     | 0,38   |
| Döner                         | 6  | 0,042±0,002               | 0,042±0,002     | 0,038±0,002 | 0,01     | 0,02   |
| Köfte                         | 6  | 0,139±0,004               | 0,142±0,003     | 0,141±0,002 | 0,28     | 0,44   |
| Hamburger                     | 6  | 0,239±0,005               | 0,239±0,005     | 0,237±0,003 | 0,44     | 0,54   |
| FAPAS TET018RM                | 6  | 0,692±0,008               | 0,693±0,008     | 0,692±0,007 | 0,94     | 0,91   |
| Korelasyon Katsayısı (SH ile) | 36 | 0,999                     | 0,998           |             |          |        |
| Regresyon Denklemi *(SH ile)  | 36 | Y=0,997x+0,001            | Y=0,998x+0,0007 |             |          |        |

\*: x = NMKL-AOAC(SH), y = Mikrodalga hidroliz

\*\* = t kritik (iki uçlu) değeri 2,57'dir. Elde edilen t değerleri t-kritik'den küçük olduğundan, sonuçlar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir.

Her iki mikrodalga hidroliz yöntemiyle de (Basınç kontrollü mikrodalga hidroliz yöntemi ve sıcaklık kontrollü mikrodalga hidroliz yöntemi) standart hidroliz ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. Her bir çeşit et ürünü için elde edilen ortalamalar ve standart sapmaları yakınlık göstermektedir. Mikrodalga ile hidroliz yöntemleri ve standart metod arasında yapılan t-test sonucuna göre sonuçlar arasındaki fark istatistikî açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Korelasyon katsayıları 1'e yakındır.

Sonuç olarak; mikrodalga hidroliz yöntemiyle (basınç kontrollü veya sıcaklık kontrollü) NMKL-AOAC standart hidroliz metodu (Anonim 1990)

arasında yakın ve tutarlı sonuçlar elde edilmekle beraber, mikrodalga hidroliz yönteminin kısa zamanda tamamlanması ve düşük hacimlerde çalışılmasından dolayı çalışma kolaylığı sağlamaktadır.

Basınç kontrollü hidroliz programı, sıcaklık kontrollü hidroliz programından daha kısa sürede gerçekleşmektedir. İlerde yapılacak olan çalışmalarda et ve et ürünlerinde gelişmiş mikrodalga protein hidroliz sistemlerinin araştırılması, et ve et ürünlerinde hidroksiprolin miktarının spektrometrik ve kromatografik olarak daha hızlı ve basit yöntemlerle belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

#### 4. Kaynaklar

Anonim,1990. Hydroxyproline in Meat and Meat Products Colorimetric Method First Action NMKL-AOAC Method, Genel Yayın No: 990.26

Chen, ST, Chiou SH, Chu YH and Wang KT., 1987. Rapid Hydrolysis of Proteins and Peptides by Means of Microwave Technology and Its Application to Amino Acid Analysis. *Int J Pept Protein Res* 30: 572-576.

Engelhart, G.W., 1990. Microwave Hydrolysis of Peptides and Proteins for Aminoacid Analysis. *Am Biotechnol Lab.*:8(15): 30-34.

Gilman, L.B. and Woodward C., 1989. An Evaluation of Microwave Heating for the Vapor Phase Hydrolysis of Proteins: I Comparison to Vapor Phase Hydrolysis for 24 hours. The Protein Society. Third Symposium, July 31. Seattle, WA, USA, Poster Paper M 197.

Kolar, K. and Berg H., 1990. Microwave Hydrolysis for Rapid Determination of Hydroxyproline in Meat and Meat Products. <http://www.cem.de/documents/pdf/publikation/protheinhydrolyse/RH018.PDF> İnternet Erişimi. 01.10.2019.

Laakkonen, E., Wellington G. H. and Sherbon J. N., 1970. Low-Temperature, Long-Time Heating of Bovine Muscle 1. Changes in Tenderness, Water-Binding Capacity, pH and amount of Water-Soluble Components. *J. Food Sci.* 35:175-177. doi: 10.1111/j.1365-2621.1970.tb12131.x.

Marconi, E., Panfili, G., Bruschi, L., Vivanti, V. and Pizzoferrato, L., 1995. Comparative Study on Microwave and Conventional Methods for Protein Hydrolysis in Food. *Amino Acids*, 8: 201-208.

Messia, M.C., Falco T. Di, Panfili G. and Marconi E., 2008. Rapid Determination of Collagen in Meat-Based Foods by Microwave Hydrolysis of Proteins and HPAEC-PAD Analysis of 4-hydroxyproline. *Meat Science* 80: 401-409.

Moore S., Spackman D.H. and Stein W.H., 1958. Chromotography of Amino Acids on Sulphonated Polystyrene Resin. An Improved System. *Anal. Chem.* 30: 1190-1196.

Young, V.R. and Pellett P.L., 1984 Background Paper 5: Amino Acid Composition in Relation to Protein Nutritional Quality of Meat and Poultry Products 1'2. *The American Journal of Clinical Nutrition.*:40 September: 737-742.

Zarkadas, C.G., Meighen, E.A., Zarkadas, G.C., Karatzas, C.N., Khalili, A.D. and Rochemont, J.A. 1988. Determination of the Myofibrillar and Connective Tissue Proteins in the Bovine Diaphragm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6): 1095-1109.