

# BEZELYE (*Pisum sativum*)'NİN C VİTAMİNİ, RENK ve PROTEİN YAPISI GİBİ ÖNEMLİ KALİTE KRİTERLERİ ÜZERİNE IŞINLAMANIN ETKİSİ

Ayça AYLANGAN<sup>1)</sup>, Berna ÖZYARDIMCI<sup>2)</sup>, Erhan İÇ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Teknikler Bölümü, Gıda Birimi, Kazan, Ankara

<sup>2)</sup> Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Araştırma Geliştirme Koordinasyon Dairesi, Dış İlişkiler Şubesi, Ankara

## Özet

Ülkemiz açısından ekonomik öneme sahip tarımsal ürünlerin ticaretinde ve özellikle ihracatta böceklenmeden kaynaklanan büyük problemler yaşanmaktadır. Taze meyve ve sebzelere uygulanacak çok düşük ışınlama dozları ile böceklenme kontrol altına alınabilmektedir. Bu nedenle ülkemize özgü daha fazla gıda ürünü ve böcek türünde çalışma yapılması, potansiyel ürünlerin ışınlama dozuna karşı duyarlılık düzeyinin tespit edilmesi önemli görülmektedir. Bu amaçla bezelye örneklerinde (*Pisum sativum*) 3 farklı ışınlama dozunun (0.25, 0.50 ve 1.00 kGy) C vitamini, renk ve proteinlerin ikincil yapısı üzerine etkisi incelenmiştir. Örneklerden C vitamini ekstraksiyonunda Hızlandırılmış Çözücü Ekstraktörü (Accelerated solvent extraction-ASE) kullanılmış ve ekstraktlar HPLC (Yüksek performans sıvı kromatografisi) kullanılarak analiz edilmiştir. Renk değerleri Minolta Kromametri ile proteinlerin ikincil yapıları ise Azalan Tam Yansıma Fourier Dönüşüm Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Işınlanmamış kontrol örneği ile kıyaslandığında ışınlanmış örneklerdeki C vitamini miktarı, ışınlama dozu arttıkça azalma göstermiştir. Işınlama dozlarının bezelye örneklerinin L\* (parlaklık), b\* (sarıklık) ve chroma (renk yoğunluğu) değerlerine etkisi istatistik olarak önemli ( $p>0.05$ ) değildir. Ancak, örneklerin yeşil rengini tanımlayan negatif a\* değerleri ışınlama dozlarından istatistik olarak önemli ( $p<0.05$ ) şekilde etkilenmiştir. Proteinlerin ikincil yapılarını oluşturan  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabakada ATR-FTIR ile yapılan inceleme sonucunda uygulanan düşük ışınlama dozlarının önemli bir değişime yol açmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bezelye, ışınlama, C vitamini, renk, protein ikincil yapısı

## 1. Giriş

Gelişmekte olan ülkelerin birçoğunda böceklenme nedeniyle gıda kayıpları ortaya çıkmaktadır. Böceklerin gıdalarımıza ortak olmaları sonucunda oluşan hasat sonrası gıda kayıpları ve kalite bozulmaları, insanların tüketimini ve değerli ürünlerin ticaretini olumsuz yönde etkilemektedir (Özyardımcı ve Çetinkaya, 2010). Dünyanın birçok ülkesinde böceklenmeden kaynaklanan gıda kayıpları hasat edilen ürünün %30'una kadar ulaşmaktadır. Depolama süresince gıdalara 600'den fazla böcek türü, 70 kadar güve ve 355 akar türünün zarar verdiği bildirilmiştir (Rajendran, 2002). Depolanmış gıdalarda böceklenmeden kaynaklanan kuru madde kaybının tahıllarda % 0.5-17 aralığında, baklagillerde ise % 50'nin üzerinde olduğu belirtilmektedir (Snelson, 1987). Gıda muhafaza yöntemlerinden biri olan gıda ışınlama ile depolama sırasında böceklenmeden kaynaklanan ürün kayıpları önlenebilmektedir. Işınlama teknolojisi gıdaların ticaretinde karşılaşılan karantina problemlerini çözen, tohum böceklerine karşı 1 kGy'in çok altında dozlarda etkinliği ve başarısı kanıtlanmış bir teknolojidir. Gıda ışınlama ile ilgili olarak Gıda ve Tarım Örgütü

(Food and Agricultural Organization, FAO), Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency, IAEA) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından kurulan komite toksikolojik, mikrobiyolojik ve beslenme açısından 10 kGy'e kadar gıdalara uygulanan dozların güvenli olduğunu belirtmiştir (Lara et al., 2002). 06.11.1999 tarih ve 23868 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Gıda Işınlama Yönetmeliği'nde baklagiller için böceklenmeyi önlemek amacıyla maksimum 1.0 kGy'e kadar ışınlama yapılmasına izin verilmektedir (Anonim, 1999; 2002; 2003). Bu çalışmada farklı dozlardaki gama ışınlarının bezelye örneklerinin C vitamini, renk ve proteinlerin ikincil yapısına etkisi incelenmiştir.

## 2. Materyal ve metod

### 2.1 Örnek ve kimyasallar

Bu çalışmada Ankara ilinde faaliyet gösteren ticari bir firmadan temin edilen ilaçlanmamış bezelye örnekleri kullanılmıştır. C vitamini (L – ascorbik asit) analizinde kullanılan standard çözelti Sigma – Aldrich (Taufkirchen, Germany) kaynaklıdır. C vitamini analizinde kullanılan tüm kimyasallar HPLC saflığında Merck Chemicals Ltd. (Dorset, England, UK)'den temin edilmiştir. Millipore membranlar (0.45 µm) Millipore'dan alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

### 2.2 Işınlama kaynağı

Örnekler polietilen ambalaj içinde 0.25; 0.50 ve 1.00 kGy'lik dozlarda ışınlanmışlardır. Işınlama işlemi, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde (SANAEM) bulunan ve Teknoloji Bölümü, Malzeme ve Dedektör Teknolojileri Birimi tarafından işletilen Gama Işınlama Tesisi bünyesindeki, deneysel amaçlar için kullanılan ve ışınlama kaynağı Co<sup>60</sup> elementi olan Gama-hücrelerinde (Issledovatelj-TENEX, Russia) yapılmıştır. Bu çalışmada, uygulanan ışınlama dozlarını tespit edebilmek amacıyla 0.1 – 3 kGy'lik doz aralığında ölçüm yapabilen Harwell perspex dozimetreler (Harwell Gammachrome YR<sup>®</sup>, Perspex Dosimeter, Batch 62, Harwell, UK) kullanılmıştır. Işınlamadan sonra tüm bezelye örnekleri +4 °C'de depolanmışlardır.

### 2.3 Renk ölçümleri

Örneklerde ışınlama dozuna bağlı oluşabilecek renk değişimleri CR 310 Minolta Kromometresi kullanılarak yapılmıştır. Hunter-Lab'ın üç farklı aksı (CIE L\*, a\*, b\*) değişik renkleri temsil etmektedir. L\* aksı parlaklık aksı olarak belirlenmiştir. a\* aksı kırmızı-yeşil aksı, b\* aksı sarı-mavi aksı tanımlamaktadır. Akslardaki değişim rengi belirlemektedir. Ayrıca, kırmızılık ve sarılık arasındaki renk ilişkisini gösteren hue ve renk yoğunluğunu temsil eden chroma değerleri de aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (Devatkal ve ark., 2004).

$$Chroma = \sqrt{a^2 + b^2}$$

$$Hue\ angle = \tan^{-1} \left| \frac{b}{a} \right|$$

### 2.4 Protein yapısındaki değişimin incelenmesi

Işınlamanın bezelye protein yapısı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır (Muyonga ve ark., 2004). Bezelye örnekleri bir gece boyunca

50 °C'de kurutulmuştur. Kurumuş ve homojen hale getirilmiş örnekler (yaklaşık 1 g) yatay ATR ZnSe tablasına yerleştirilmiş ve 4500 – 650 cm<sup>-1</sup>'lik bölgede, 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte, 64 tarama yapılarak absorpsiyon sonuçları alınmıştır. Örnekler tarama yapılmadan önce, referans olarak boş ATR kristali kullanılarak background spektrumu alınmıştır.

### **2.5 C vitamini analizi**

Örneklerden C vitamini ekstraksiyonu Abushita ve ark. (1997)'na göre ve Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu için bazı modifikasyonlar (Accelerated solvent extraction-ASE) Hossain ve ark. (2011)'na göre yapılmıştır. Ekstraksiyondan önce tüm örnekler -18°C'de depolanmıştır. Tüm ekstraksiyonlar HPLC'ye enjeksiyondan hemen önce gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşamasında ve tüm analiz boyunca ekstraktlar soğukta tutulmuş ve gün ışından korunmuştur. Numune hazırlama işlemi her örnek için iki paralel şekilde yapılmış, her ekstrakt HPLC'ye üç kez enjekte edilmiştir.

ASE (Dionex ASE 350 model) ile C vitamini ekstraksiyonunda, paslanmaz çelik 5 ml'lik ASE hücresine 3 g donmuş örnek tartılmış, çözücüden gelebilecek herhangi bir safsızlığı önlemek amacıyla üzerine selüloz filtreler (Dionex, 27 mm çap) yerleştirilmiştir. Ekstraksiyon hücresi ASE'ye yerleştirildikten sonra ekstraksiyon aşağıdaki şartlarda yürütülmüştür.

Analitik saflıkta, taze olarak hazırlanmış ve soğukta (+4°C) depolanan metafosforik asit (%3 w/v) ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon ortam sıcaklığında, 9.652.650 – 10.342.125 Pa basınç altında 5 dakikalık iki döngü şeklinde yapılmıştır. Azot gazının boşaltma süresi 90 saniyedir. Hacmi bilinen ekstrakt toplandıktan sonra HPLC analizi için 0.45 mikronluk hidrofilik membrandan koyu renkli viallere filtre edilmiştir. Analizde kullanılan HPLC sisteminin (Waters 2695 Separations Module and Waters 2996 Photodiode Array Detector Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) özellikleri şu şekildedir. Dedektör sinyal aralığı: 190 – 44 nm. C vitamini piki 243.8 nm'de gözlenmiştir. Enjeksiyon analitik kolana 10µL olacak şekilde (EC 150/4.6 Nucleosil, 100-3 C18 Nautilus Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany) yapılmıştır. Mobil faz olarak 0.7 mL/dakikalık akış oranında %1 (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi ve asetonitril kullanılmıştır. Elüsyon şartları % 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.01-3 dakika: % 99,10 dakika: % 70, 15 dakika: % 60, 18-20 dakika: % 99 şeklindedir. Standard C vitamini (L-askorbik asit) çözeltisi % 3 MPA ile hazırlanmış ve HPLC kolonuna örnekler ile aynı şartlarda enjekte edilmiştir. Analiz sayısal değerleri standard kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

### **2.6 İstatistiksel analiz**

DeneySEL çalışmalarda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde IBM SPSS 21.00 paket programı kullanılmış, öncelikle varyans çözümlemesi tekniği ve ardından önemli bulunan değişkenlere Duncan testi uygulanmıştır. İstatistiksel olarak  $P \leq 0.05$ . bulunduğunda, ışınlama dozunun etkisi önemli olarak kabul edilmiştir.

## **3. Sonuçlar**

Örneklerdeki C vitamini ekstraksiyonu HPLC'ye enjeksiyondan hemen önce yapılmıştır. ASE ile 2 defa ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve NaSO<sub>4</sub> ile saflaştırılma yapıldıktan sonra, ekstrakt L-askorbik asitin dehidroaskorbik asite dönüşümünü engellemek amacıyla hemen HPLC'ye enjekte edilmiştir. L-askorbik asit ve dehidroaskorbik asiti ayırt etmek ve miktarının tespit etmek amacıyla, her iki asite ait standard çözeltiler ayrı ayrı HPLC'ye enjekte edilmiştir. Yaklaşık olarak 2,5 dakikalık alıkonma süresinde her iki asite ait pik gözlenmiştir ve her iki pik çakışmaktadır. Toplam C vitamini içeriğinin hesaplanmasında L-

askorbik asit ve dehidroaskorbik asit birlikte değerlendirilmiştir (Llyod ve ark. 1987). Kromatogramda 2,5 dakikalık alıkonma süresinde gözlenen pik toplam C vitamini piki olarak tanımlanmıştır. Bezelye örneklerine ait toplam C vitamini sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir. Işınlama işleminin C vitamininde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Işınlanmamış kontrol örneğinde C vitamini miktarı 12.34 mg/100 g iken böceklenmeyi önlemek için izin verilen en yüksek 1 kGy’lik ışınlama dozunda miktar 10.90 mg/100 g’a düşmektedir. Işınlanmamış kontrol örneği ile ışınlanmış örnekler karşılaştırıldığında C vitamini miktarı açısından aradaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur.

**Tablo 1.** Bezelye örneklerindeki C Vitamini miktarı

	Doz (kGy) <sup>a</sup>			
	0	0.25	0.50	1.0
C Vitamini (mg/100 g)	12.3 ± 0.0c	12.1 ± 1.0bc	11.0 ± 0.3ab	10.9 ± 0.4a

<sup>a</sup> Farklı harf taşıyan örnekler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P \leq 0.05$ )

Işınlanmamış kontrol örneği ve 3 farklı dozda ışınlanmış bezelye örneklerindeki renk değerleri Tablo 2’de gösterilmektedir. L\* değerleri incelendiğinde ışınlama işleminin örneklerin parlaklık değerlerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Negatif a\* değerleri örneklerde yeşil rengi tanımlamaktadır. Çalışmada uygulanan ışınlama dozları a\* değerlerinin istatistik olarak önemli şekilde etkilemiştir. Işınlama dozlarının bezelyelerde sarı rengi temsil eden b\* değerlerine ve kroma değerlerine önemli bir etkisi olmamıştır.

**Tablo 2.** Bezelye örneklerinin renk değerleri

	Doz (kGy) <sup>a</sup>			
	0.0	0.25	0.50	1.0
<b>L</b>	55.4 ± 0.4a	55.5 ± 0.0a	55.9 ± 0.5a	56.0 ± 0.1a
<b>a</b>	-17.7 ± 0.1c	-17.2 ± 0.1a	-17.6 ± 0.0bc	-17.4 ± 0.0b
<b>b</b>	31.9 ± 6.1a	24.9 ± 5.6a	28.5 ± 0.4a	28.7 ± 0.1a
<b>C</b>	33.6 ± 0.3a	33.1 ± 0.1a	33.5 ± 0.4a	33.6 ± 0.1a
<b>h</b>	121.8 ± 0.1b	121.3 ± 0.0a	121.7 ± 0.2b	121.3 ± 0.1a

<sup>a</sup> Farklı harf taşıyan örnekler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P \leq 0.05$ )

ATR-FTIR ile bezelye örneklerinde ışınlamanın etkisi ile proteinde meydana gelebilecek yapısal ve konformasyonel değişiklikleri hızlı bir şekilde incelemek amaçlanmıştır. Proteinlerin ikincil yapısı temel olarak  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabakadan oluşmaktadır. Amid I bantında  $\alpha$ -sarmal tipik olarak 1648 – 1658 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda pik verirken,  $\beta$ -düzlemsel tabaka 1620 – 1640 cm<sup>-1</sup>’de absorpsiyon vermektedir (Withana-Gamage et al. 2010; Amonsou et al. 2012). Protein değeri sadece toplam protein içeriğine değil, proteinin iç yapısı

ve gıdanın matriksine de bağlıdır. Proteinin içyapısı proteinlerin gastrointestinal sindirim enzimleri ile etkileşimini etkilemektedir. Proteinlerin besleyici değeri, sindirilebilirliği ve yararlılığı doğrudan içyapısında bulunan  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabakaya bağlı değildir. Ancak, protein tipleri ve sindirim sistemindeki enzimatik hidrolize yatkınlığı büyük ölçüde proteinin içyapısı ile ilişkilidir. Yüksek  $\alpha$ -sarmal/  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranı intestinal sindirim enzimleriyle etkileşimi azaltarak, protein değerinin azalmasına neden olabilmektedir. Aynı protein içeriğine sahip gıdalar, proteinlerin ikincil yapısındaki  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranı farklı ise besleyici değerleri farklı olabilmektedir (Yu, 2007).  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranının protein kalitesi hakkında temel bir bilgi verdiği söylenebilir. Tablo 3’de ışınlanmış ve ışınlanmamış kontrol bezelye örneklerinin FTIR spektrumları dikkate alınarak OPUS (Optics User Software) bilgisayar programı kullanılarak hesaplanan  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka’nın % değerleri ve  $\alpha$ -sarmal/  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranı verilmiştir.

Amid I bölgesinin analizi sonucunda ışınlanmamış kontrol örneğinde  $\alpha$ - sarmal değeri % 30.5 ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka değeri % 46.6 bulunurken, üç farklı dozda (0.25, 0.50 ve 1.0 kGy) ışınlanmış örneklerde bu değerler sırasıyla % 26.2  $\alpha$ -sarmal, % 47.5  $\beta$ -düzlemsel tabaka; % 26.9  $\alpha$ -sarmal, % 46.8  $\beta$ -düzlemsel tabaka ve % 27.6  $\alpha$ -sarmal, % 47.2  $\beta$ -düzlemsel tabaka olarak bulunmuştur. Işınlama dozu arttıkça  $\alpha$ -sarmal/  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranında azalma olduğu gözlenmiştir. Uygulanan üç farklı ışınlama dozunda (0.25, 0.50 ve 1.0 kGy)  $\alpha$ -sarmal/  $\beta$ -düzlemsel tabaka oranında sırasıyla % 16.6, % 12.1 ve % 10.6 olarak bulunmuştur. Bezelye örneklerinin proteinlerinin ikincil yapılarında ışınlama işlemine bağlı olarak gözlenen farklılık istatistik analiz sonucunda da önemli olarak bulunmuştur.

**Tablo 3.** Proteinlerin ikincil yapısına ait sonuçlar

	Doz (kGy) <sup>a</sup>			
	0	0.25	0.50	1.0
$\alpha$ - sarmal (%)	30.5 ± 4.1b	26.2 ± 2.7a	26.9 ± 2.1ab	27.6 ± 3.4ab
$\beta$ -düzlemsel (%)	46.6 ± 0.5a	47.5 ± 0.5b	46.8 ± 0.4a	47.2 ± 0.6ab
$\alpha$ - sarmal/ $\beta$ -düzlemsel	0.6 ± 0.0b	0.5 ± 0.0a	0.5 ± 0.0ab	0.5 ± 0.0ab

<sup>a</sup> Farklı harf taşıyan örnekler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P \leq 0.05$ )

## Kaynaklar

Abushita AA, Hebshi EA, Daood HG, Biacs PA. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. Food Chemistry. 60, 2, 207-212.

Amonsou EO, Taylor JRN, Emmambux MN, Duodu KG, Minnaar A. 2012. Highly viscous dough-forming properties of marama protein. Food Chemistry. 134: 1519-1526.

Anonim. 2002. Gıda Işınlama Yönetmeliğinde değişiklik yapılması hakkında yönetmelik. 15.10.2002 tarih ve 24907 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonim. 2003. Gıda Işınlama Yönetmeliğinde değişiklik yapılması hakkında yönetmelik. 19.12.2003 tarih ve 25321 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonim.1999. Gıda İşınlama Yönetmeliği. 06.11.1999 tarih ve 23868 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Devatkal S, Mendiratta SK, Kondaiah N. 2004. Quality characteristics of loaves from buffalo meat, liver and vegetables. *Meat Science*. 67, 3, 377-383.

Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology, *Analytical methods*. Food Chemistry. 126, 339-346.

Lara JD, Fernandez PS, Periago PM, Palop A. 2002. Irradiation of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with electron beams. *Innovative Food Sci. and Emerg. Technol.* 3, 379 – 384.

Llyod L, Warner FP, White CA, Kennedy JF. 1987. Quantitative reverse phase HPLC analysis of L-ascorbic acid (vitamin C) and identification of its degradation products. *Chromatographia* 24: 371-376.

Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 86: 325 – 332.

Özyardımcı B, Çetinkaya N. 2010. İşınlama Teknolojisinin Böceklenmeye Karşı kullanımı ve karantina amaçlı uygulanması, Gıda İşınlama, TAEK El Kitapları Serisi, 179 sayfa.

Rajendran S. 2002. Postharvet pest losses. In “*Encyclopedia of Pest Management*” (D. Pimentel, ed.), pp. 654-657. Marcel-Dekker, New York.

Snelson JT. 1987. Grain Protectants. ACIAR Monograph 3. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

Stewart EM. 2001. Food Irradiation Chemistry, Edited by R.A. Molins, Food Irradiation: Principles and Applications, The National Academies, John Wiley & Sons, Inc., Publication, Canada. 469 s.

Withana-Gamage TS, Wanasundara JPD, Pietrasika Z, Shanda PJ. 2010. Physicochemical, thermal and functional characterization of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L): A comparative study with soy (Glycinemax) and pea (*Pisum sativum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1022-1031.

Yu P. 2007. Protein molecular structures, protein sub fractions, and protein availability affected by heat processing: A review. *Am. Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3: 66-86.