

# BETA KAROTEN OKSİDASYONUNA SICAKLIK, IŞIK, SÜRE ve GALLİK ASİTİN ETKİSİ

## ÖZET

**B**u çalışmada betakaroten oksidasyonuna sıcaklık, ışık, süre ve gallik asitin etkisi araştırılmıştır. Soğukta ve karanlıkta muhafaza edilen örneklerde gallik asit son derece olumlu sonuç vermiştir. Bu etki düşük dozlarda bile önemli düzeydedir. Depolama sıcaklığı arttıkça gallik asitin etkisi azalmaktadır.  $20 \pm 2$  °C sıcakta ve aydınlıkta gallik asit trolox'tan daha etkilidir. Özellikle belirli dozların üzerine çıkıldığında gallik asit, araştırmada incelenen her üç koşulda da son derece güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Işığın oksidasyon üzerindeki etkisi sıcaklıktan daha fazla olmuştur.

## THE EFFECTS OF TEMPERATURE, LIGHT, TIME AND GALLIC ACID ON BETA CAROTENE OXIDATION

### ABSTRACT

The effects of temperature, light, time and gallic acid on betacarotene oxidation were investigated. Gallic acid has given the best results in all samples that were being kept under cold and dark conditions. This positive effect was also observed at quite low doses. Increase in storage temperature diminished the protective effect of gallic acid. The effect of gallic acid was found to be stronger than trolox, especially above the certain dosages. Light was found to be more effective on oxidation rather than temperature.

### GİRİŞ

İnsanların sağlıklı ve uzun bir yaşam sürmesi üzerine beslenmenin etkisinin kesin bir şekilde ortaya konulmasından sonra gelişmiş ülkelerde özellikle son yıllarda doğal antioksidan tüketimi üzerinde çok durulmaya başlanmıştır. İnsanların doğal metabolizmasında enerji kaynağı olan karbonun oksijen ile yanması sonucunda karbondioksitin yanı sıra, bir kısım oksijenin tam olarak reaksiyona girmemesi sonucunda oluşan ve serbest radikal olarak adlandırılan bileşikler ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin en önemli özelliği son derece reaktif olmalarıdır. Bu bileşikler karşılaştıkları her madde ile reaksiyona girebilmektedirler. Dolayısıyla radikaller hücre yapısında bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar verebilmekte ve sonuçta başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa yol açmaktadırlar (BERMOND, 1990; THURNHAM, 1993; THOMAS, 1995). Serbest radikallerden kaynaklanan hasarlara karşı vücudun geliştirdiği bazı savunma mekanizmaları vardır. Bunlar, enzim sistemleri, vitaminler, antioksidan mineraller ve gıdaların bileşiminde bulunan diğer bileşiklerdir (VELİOĞLU, 2000). Kanser, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklara karşı meyve sebzelerin sağladığı koruma, onların içerdiği çeşitli antioksidanlarla ilgilidir. Nükleik asit, protein, lipitlerin oksidatif zararlanmalarına serbest radikallerin neden olduğunu gösteren

Ender Sinan POYRAZOĞLU  
Sedat VELİOĞLU

Ankara Üniversitesi,  
Mühendislik Fakültesi, Gıda  
Mühendisliği Bölümü

güçlü kanıtlar vardır. Bu yüzden serbest radikalleri nötralize edebilen antioksidanların bu hastalıklardan korumadaki esas önemi ortaya çıkmaktadır. Meyve ve sebzeler, birçok farklı antioksidan bileşenleri içerir. Bu meyve ve sebzelerin antioksidan kapasitesinin çoğunluğu vitamin-C, vitamin-E yada betakarotenin dışındaki başka bileşiklerden olabilir. Örneğin güçlü oksidan aktivite gösteren ve insan diyetinin bileşenleri olan bazı flavonoidler, flavonlar, antosiyaninler bunlardan bazılarıdır. Bu yüzden bir meyve ve sebzenin toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için yapılarında bulunan toplam fenolik madde miktarı önemlidir (WANG ve ark., 1996).

Gıdalarda oluşan oksidasyonun sonunda, başlangıçta gıdanın duyu kalitesinde azalmalar ortaya çıkmakta ve koşullara bağlı olarak gıda giderek tüketilebilirliğini tamamen kaybetmektedir. Gıdalardaki oksidasyonu önlemek veya azaltmak amacıyla günümüzde BHA (bütilhidroksianisol), BHT (bütilhidroksitoluen), TBHQ (tertiarybütilhidrokinon) gibi ticari antioksidanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Oysa, tüketiciler bu bileşenlerin mutajen, karsinojen, teratojen etkilerinin bulunması olasılığı nedeniyle kullanımlarına her zaman kuşku ile bakmıştır ve bu nedenle gıdalarda doğal katkı maddelerinin kullanımını tüketiciler her zaman tercih etmektedirler (PRATT, 1992). Son yıllarda yapılan çalışmalarda baharatlar katı ve sıvı yağların acılaşmasını önlemede doğal antioksidan kaynakları olarak gösterilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, mercanköşk (*Origanum vulgare* L.) yapraklarından. fenil glukozit, prokateşik asit, kafeik asit, rosmarinik asit ve fenilpropionik asit gibi fenolik bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin tamamı alfa-tokoferol ve BHA'dan daha fazla antioksidatif etki göstermişlerdir (KIKUZAKI ve NAKATANI, 1989). Saf zeytinyağında önemli miktarlarda fenolik bileşikler bulunmaktadır. Bu bileşikler zeytin yağının işleme aşamalarında kayba uğramaktadırlar ve bunlar arasında kafeik, p-kumarik, siringik, vanilik, ferulik, prokateşik ve p-hidroksibenzoik asitler zeytinyağından izole edilmişlerdir. Zeytinyağında hakim olan fenolik asit p-kumarik asit olarak tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin tamamı yağların aromalarının korunmasında antioksidan olarak görev yapmaktadırlar (NERGİZ ve ÜNAL, 1991).

Gallik asitin ve bunun propil,metil ve lauril esterlerinin antioksidan ve prooksidan etkilerinin incelendiği bir çalışmada lauril ester (GL), propil gallat (PG) ve gallik asit metil esterinin (GM) etanolde eriyince fosfolipit lizozomlarının peroksittenmesini azalttığı ortaya konulmuştur. Gallik asitin ise sadece çok sınırlı bir yavaşlatıcı etkisi vardır. Bu antioksidan özelliklerine zıt olarak GA, GM, PG adlı bileşikler hidrojen peroksit ve Ferrik-EDTA'da deoksiriboza zarar vermeyi hızlandırmaktadır. Bununla beraber, gallik asit ferrikleomycin sistemiyle DNA hasarını hızlandırır. GM daha az

etkilidir. GL ise hiç etkili değildir (ARUOMA ve ark., 1993). Gıdalarda bulunan bazı fenolik asitlerin ve bunların hidroksi ve metoksi türevlerinin antioksidan kapasitesi trolox ekivalent (TEAC) birimi üzerinden hesaplanmış ve belirlenen değerler bilinen bazı antioksidanların TEAC değerleri ile karşılaştırılmıştır. p-kumarik asit (4-hidroksisünamik asit) ve gallik asitin sırasıyla 2.2 ve 3.0 TEAC değerlerine sahip olduğu görülmüştür (MILLER ve RICE-EVANS, 1997).

Bu çalışmada tahıllar, yağlı tohumlar, bazı meyve sebzeler gibi pek çok gıdanın bileşiminde doğal olarak bulunan beta karotenin oksidasyonu üzerine, pek çok sebze ve meyvede doğal olarak bulunan bir fenolik asit olan gallik asitin etkisi linoleik asit ortamında incelenmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Araştırmalarda oksidasyon düzeyinin saptanması için modifiye edilmiş betakaroten ağartma yöntemi kullanılmıştır (MARCO, 1968). Denemede kullanılan çözütliler aşağıda verilmiştir.

### Çözütliler

Beta karoten çözeltisi: 20 mg beta karoten (Sigma) 100 ml kloroformda çözündürülmüştür.

Gallik asit çözeltisi: 2.5 mg gallik asit (Sigma) 100 ml metanolde çözündürülmüştür.

Trolox çözeltisi: 5 mg trolox C (Sigma) 100 ml %80 lik metanolde çözündürülmüştür.

Linoleik asit (Sigma): Saf halde kullanılmıştır.

Tween 20 (Sigma): Saf halde kullanılmıştır.

### İşlem

10 mL betakaroten çözeltisi, 0.1 mL linoleik asit ve 1 mL Tween 20 karıştırıldıktan sonra kloroform 50°C'de rotary evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Bu karışımın üzerine hava ile doyurulmuş 270 ml damıtık su eklenip yavaşça karıştırılmıştır. Karışımın ağız kapaklı cam tüplere 15'er mL konulmuş ve Tablo 1'de belirtilen uygulamalar yapılmıştır. Kontrol olarak hazırlanan örneklere gallik asit veya trolox konulmamıştır. Gallik asitin su içerisinde 1000 ppm'lik çözeltisi hazırlanarak uygulama yapılmış, son hacmin tüm tüplerde aynı olması için karışım miktarında gereken ayarlama yapılmıştır.

### Yöntem

Örnekteki oksidasyon derecesi, betakarotenin rengindeki azalmanın 470 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile saptanmıştır. Bu aşamada tüplerdeki örneklerde belirli sürelerde absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçümlerde şahit olarak damıtık su kullanılmıştır.

Oksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

Örneklerdeki oksidasyon düzeyinin hesaplanmasında AA (Antioksidan aktivitesi) ve AAC (Antioksidan değeri) parametrelerinden yararlanılmaktadır. Hesaplama aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır (MALLETT ve ark., 1994).

$$(1) AAC = \frac{A\ddot{o}(x.g\ddot{u}n)-Ak(x.g\ddot{u}n)}{Ak(0.g\ddot{u}n)-Ak(x.g\ddot{u}n)} \times 1000$$

Aö:Örneğin absorbanı, Ak:Kontrolün absorbanı,  
x:AAC'nin belirlenmek istendiği gün

$$(2) AA = \frac{\text{Kontrolün bozulma oranı} - \text{Örneğin bozulma oranı}}{\text{Kontrolün bozulma oranı}}$$

Bozulma oranı =  $\ln(a/b) \times 1/t$

a: Sıfırıncı gündeki absorband, b: x. gündeki absorband, t:gün

**SONUÇLAR ve TARTIŞMA**

Farklı koşullarda muhafaza edilen örneklerde yapılan absorban ölçümlerine ilişkin sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2'den görüleceği üzere antioksidan kullanılmayan tüm örneklerde yaklaşık 5 gün içerisinde betakaroten tamamen okside olmuştur. Buna karşın uygulanan antioksidan dozuna ve uygulama şekline bağlı olarak kimi örneklerde 2.5 aylık depolama süresinin sonunda bile betakaroten varlığını korumaktadır. Yukarıda, yöntem bölümünde belirtildiği gibi, betakaroten çözeltisi üzerine oksijenli su konulmuş ve oksidasyon özellikle hızlandırılmaya çalışılmıştır. Bu oksijenli su uygulaması yapılmıyaydı betakarotenin çok daha uzun süre stabil kalacağı açıktır. Tablo 2'deki değerlerden yararlanılarak hesaplanan AA ve AAC değerleri grafiğe işlenmiştir (Şekil 1). Her üç uygulamada da uygulanan gallik asit oranına bağlı olarak antioksidatif aktivitenin önemli düzeyde arttığı ve betakarotenin oksidasyonunun yavaşladığı görülmektedir. Burada üzerinde durulması

**Tablo 1.** Deneme Deseni

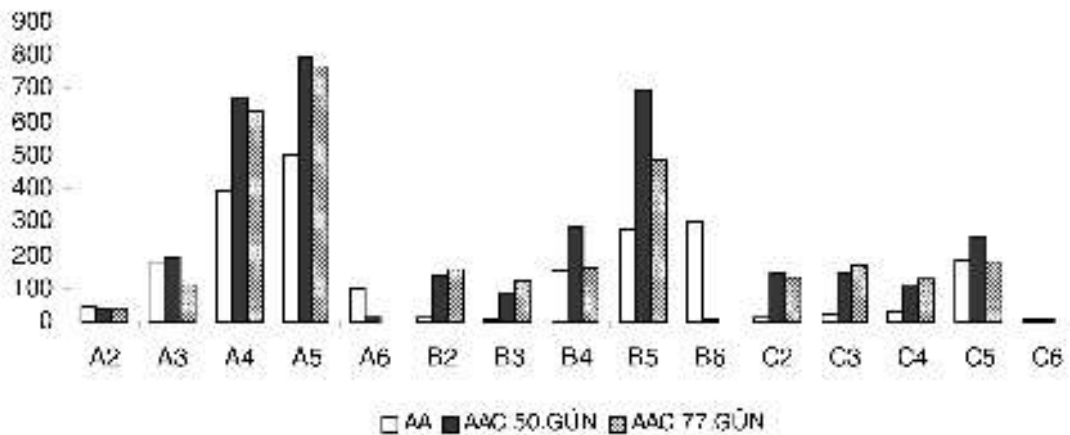
GRUP ADI	DENEME NO	UYGULAMA DOZU (mg gallik a. /15 mL)	MUHAFAZA YÖNTEMİ	SÜRE
A	1	Kontrol	+4 °C, karanlık,	Maksimum 77 gün veya sıfır absorbanı ulaşılan kadar
	2	0.25		
	3	0.50		
	4	1.25		
	5	2.5		
	6	12.5 mg Trolox		
B	1	Kontrol	20±2 °C, karanlık,	
	2	0.25		
	3	0.50		
	4	1.25		
	5	2.5		
	6	12.5 mg Trolox		
C	1	Kontrol	20±2 °C, gün ışığı.	
	2	0.25		
	3	0.50		
	4	1.25		
	5	2.5		
	6	12.5 mg Trolox		

**Tablo 2.** Uygulanan Muhafaza Süresine Bağlı Olarak Örneklerin Absorbansındaki Değişim

Kod No	ABSORBANS													
	SÜRE (GÜN)													
	0	5	8	10	12	15	17	18	38	50	65	70	72	77
A1	0,630	0,031	0	0,004	0,002	0,003	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0,632	0,432	0,271	0,224	0,174	0,120	0,096	0,088	0,035	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
A3	0,632	0,543	0,458	0,429	0,391	0,348	0,318	0,303	0,176	0,120	0,089	0,088	0,080	0,069
A4	0,636	0,622	0,576	0,572	0,551	0,528	0,514	0,510	0,450	0,426	0,410	0,400	0,403	0,398
A5	0,624	0,600	0,585	0,584	0,572	0,557	0,547	0,548	0,512	0,500	0,487	0,477	0,483	0,482
A6	0,604	0,508	0,422	0,384	0,313	0,219	0,136	0,080	0,011	0,006	0,006	0	0	0
B1	0,610	0,013	0	0,003	0	0,002	0,002	0	0	0	0	0	0	0
B2	0,626	0,040	0,018	0,027	0,031	0,041	0,050	0,077	0,060	0,086	0,095	0,103	0,116	0,095
B3	0,635	0,224	0,136	0,105	0,064	0,044	0,039	0,034	0,041	0,052	0,066	0,071	0,077	0,073
B4	0,632	0,474	0,415	0,395	0,371	0,340	0,324	0,315	0,247	0,174	0,116	0,106	0,106	0,100
B5	0,627	0,549	0,510	0,496	0,477	0,474	0,471	0,476	0,452	0,424	0,333	0,325	0,131	0,298
B6	0,604	0,605	0	0,002	0,001	0,001	0	0	0,007	0,002	0	0	0	0
C1	0,608	0	0	0,002	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0,624	0,015	0,017	0,034	0,043	0,049	0,052	0,052	0,049	0,089	0,095	0,104	0,088	0,082
C3	0,627	0,178	0,010	0,076	0,075	0,079	0,085	0,088	0,083	0,088	0,095	0,106	0,102	0,101
C4	0,638	0,443	0,345	0,299	0,245	0,119	0,163	0,141	0,062	0,068	0,069	0,079	0,080	0,076
C5	0,631	0,547	0,486	0,454	0,418	0,391	0,371	0,359	0,221	0,154	0,117	0,116	0,122	0,109
C6	0,595	0,004	0	0,001	0,002	0,002	0	0	0,008	0,003	0,003	0,007	0	0

gereken en önemli bulgu, en yüksek miktarda gallik asit içeren A5 kodlu örnekte (karanlıkta-buzdolabında) AA değerinin Trolox'a göre 5 kat fazla çıkmasıdır ki bu örnekteki gallik asit dozu, Trolox'un dozunun ancak %20'si kadardır. Örneklerin  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , sıcakta muhafaza edilmesi durumunda stabilite azalmaktadır, ancak yüksek dozlarda gallik asit kullanımı ile sıcaklık artışından kaynaklanan hızlı bozulma önemli düzeyde azaltılabilmektedir. Gene burada

da yüksek dozlardaki gallik asit uygulaması, trolox'tan daha etkin olmakla birlikte düşük dozlarda sonuç yetersizdir ve bu durum gallik asitin yüksek sıcaklıklarda iyi bir antioksidan olamayacağını ortaya koymaktadır. Işıktaki ve  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcakta depolanan örneklerde bozulma beklendiği üzere çok hızlanmıştır. Burada yüksek dozlardaki gallik asit uygulaması ve trolox koruyucu etki göstermemektedir. Gene de gallik asitin trolox'tan daha etkili olduğu söylenebilir.

**Şekil 1:** Farklı koşullarda muhafaza edilen örneklerde AA ve AAC değerlerindeki değişim

Sonuç olarak, özellikle karanlıkta ve soğukta muhafaza edilen örneklerde gallik asit düşük dozlarda bile çok güçlü antioksidan etki göstermiştir, ancak sıcaklığın artması ve ışığın da etkisi durumunda gallik asit ve trolox etkili olmamaktadır. Bu durumda BHA, BHT vb. başka antioksidanlara veya daha yüksek dozlara gereksinim duyulacaktır. Şekil 1'de dikkati çeken diğer bir önemli bulgu da ışığın olumsuz etkisinin sıcaklığa göre daha fazla olmasıdır.

#### KAYNAKLAR

- ARUOMA, I.O., MURCIA, A., BUTTER, J. And HALLIWELL, B., 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. J. Agric. Fd. Chem. 41(11):1880-1885.
- BERMOND, P. 1990. Biological Effects of Food Antioxidants. In "Food Antioxidants" (Ed: B.J.F.Hudson). Elsevier Sci. Barking. England. p. 193-252.
- KIKUZAKI, H. ve NAKATANI, N., 1989. Structure of a new antioxidative phenolic acid from Oregano (*Origanum vulgare* L.) Agric. Biol. Chem. 53 (2): 519-524 .
- MALLETT, J.F., CERRATI, C., UCCIANI, E., GANISSONA, J. and GRUBER, M. 1994. Antioxidant activity of plant leaves. Food Chem. 49: 61-65.
- MARCO, G.J.A. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 45: 594-598.
- MILLER, N.J.RICE-EVANS, C.A., 1997. Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: Antioxidant activity of plant leaves. Food Chem. 49: 61-65.
- NERGİZ, C. ve UNAL, K., 1991. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. Food Chem. 39 (2): 237-240.
- PRATT, D.E. 1992. Natural Antioxidants from Plant Material. In "Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II". Eds: MT Huang, CT Ho, CY Lee. American Chemical Society Symposium Series. 507. 54-71.
- THOMAS, M.J. 1995. The role of free radicals and antioxidants. How do we know they are working? Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35 (1 and 2): 21-39.
- THURNHAM, D.I. 1993. Chemical Aspects and Biological Mechanisms of Anticancer Nutrients in Plant Foods. In "Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects. (Eds. K.W.Waldron, J.T., Johnson, G.R. Frenwick). The Royal Society of Chemistry.p.461-487.
- VELİOĞLU, S. 2000. Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. Gıda 25(3): 167-176.
- WANG, H., CAO, G., and PRIOR, R.L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Fd. Chem. 44: 701-705. ■