

GIDA TEKNOLOJİSİ

ET VE ET ÜRÜNLERİ ANALİZLERİ

İÇİNDEKİLER :

- ET VE BİLEŞENLERİ	2
- Numune Alma	3
- Histolojik Muayeneler	4
- Serolojik Muayeneler	5
- Duyusal Muayeneler	6
- Fiziksel Muayeneler	7
• pH Değerinin Ölçümü	7
• Redokspotansiyelin Ölçümü	8
• Su Aktivitesi Değerinin Ölçümü	8
• Ultraviyole Işığı Altında İnceleme	9
- Kimyasal Muayeneler	9
• Bağlayıcı Doku Tayini	10
• Boya Maddelerinin Belirlenmesi	10
• Ham Selüloz Tayini	15
• Ham Protein Tayini	16
• Hidroksiprotein tayini	17
• Toplam Kreatinin Tayini	20
• Kokuşmanın Tayini	22
• Kül Tayini	23
• Nitrat Tayini	25
• Nitrit Tayini	26
• Nişasta Tayini	27
• Rutubet Tayini	30
• Yağ Tayini	31
• Tuz Tayini	33
• Kanın İyi Akıtılıp Akıtılmadığının Tespiti	34
• Fosfor Tayini	36
• Kalsiyum Tayini	37

ET VE ET ÜRÜNLERİ ANALİZLERİ

ET

Azotlu besi maddelerinin ve bu aşamada biyolojik değeri yüksek hayvansal proteinlerin anorganik maddelerin ve bir çok önemli vitaminlerin başlıca kaynağıdır. Et kasaplık hayvanların, kuşların, balıkların, kümes ve av hayvanlarının yenebilen kısımlarıdır. Et denilince yenebilen hayvanların kas kısımları yani daha ziyade kas eti anlaşılır. Et, başta kas dokusu olmak üzere kas, epitel, kemik, sinir, yağ ve bağ dokuları yapısında bulunduran hayvansal bir besin olarak tanımlanır.

Et ve Bileşenleri:

Etin başlıca bileşenleri su, protein, yağ ve anorganik maddelerdir. Az oranda da karbonhidrat, organik asitler, vitaminler ve enzimler bulunur. Yağı ayrılmış ette ortalama;

- % 70 – 75 Su
- % 13 – 22 Azotlu maddeler
- % 0.5 – 3.5 Yağ
- % 1 anorganik maddeler bulunur.

Sudan sonra en çok bulunan bileşeni olan protein etin en önemli kısmını oluşturur. En bol bulunan kas proteini, suda çözülmeyen globülin kompleksi, oktomyosin olup kas lifinin kasılmasından sorumludur. Etin yenmeyen kısmında önemli miktarda bulunan kologen, deri, kemik ve kaslarda bağ dokusunun temel bileşimini teşkil eder. Keratin, saç, boynuz, tırnak ve epiderminin dış tabakasını oluşturur. Elastin, kemikleri ve başka organları birbirine bağlayan bağların temel proteindir ve kan proteinleri vardır.

Et de karbonhidratlardan daha çok 0.05 – 0.18 oranında glikojen bulunur. Glikojene daha zengin karaciğerdir. Glikojenin hidrolizinden teşekkül etmiş % 0,1 - 0,5 kadarda glikoz ve maltoz bulunur.

Ete bağlı olarak bulunan yağlar daha ziyade palmitin, sterin ve olain asidin oliseridlerinden yapılmışlardır. Bunun yanında % 2 miktarda kolesterin (% 0,1 - 0,2) ve yaklaşık olarak % 2.6 – 5 lesitin vardır. Aktif biyolojik, önemli bir temel yağ asidi arahidan asit hayvansal yağda bulunur.

Etin tuzları başlıca potasyum fosfat olmak üzere kalsiyum ve magnezyum fosfat ve NaCl'den ibarettir. Az miktarda demir, miyoglobinde bulunur. Ve pek az silis ve sülfat iyonu vardır ki bunun da hemen hepsi protein kükürtünden ileri gelir. Etin külü % 0,8 - 1,8'dir.

Karaciğer, böbrek ve kalp dışında kas eti vitaminler bakımından nispeten fakirdir. Bununla birlikte var olan tiamin, riboflamin, niasin, ve B vitamin grubunun diğer üyeleri avitaminozu önleyecek miktardadırlar. Ette de A vitamini bulunmaktadır. C vitamini ise bazı araştırmacılara göre az miktarda vardır.

Numune alma :

- 1- Numune alma araç ve kapları
- 2- Kimyasal analizler için;
- 3- Numune alma araç ve kapları "kuru ve temiz olmalıdır.
- 4- Duyusal analizler için;
- 5- Numune alma araç ve kapları kuru, temiz olmalıdır. Mamule herhangi bir tat, koku bulaştırmamalıdır.

Numune Alma İşlemi:

Herhangi bir büyüklükte olup tek başına paketlenmiş veya hazırlanmış et ve et mamulleri ile ağırlıkları 2 kg'ı geçmeyen et parçaları (sosisler ve konserve mamulleri gibi)

Bir birim veya parçanın tümü partiyi temsil edecek miktarda ilk numune olarak alınır.

-Karkaslar veya ağırlıkları 2. kg'ı geçen et parçaları (kol, but kuzu karkasları gibi)

Partiyi temsil edecek miktarda alınan et numuneleri, duysal muayeneler veya laboratuarda yapılacak deney ve muayeneler (kimyasal veya bakteriyolojik) için ayrılırlar.

Karkas veya büyük et parçasından numune hiçbir zaman bütünü temsil edemez. Bu nedenle ilk numunenin alınışında, numunenin alınış amacına göre aşağıdaki yöntemlerden biri uygulanır.

- a) Yüzeysel numuneleri (Örn: koliform veya salmonella tayini için); etin bütün yüzeyi, pens ile tutulan ve steril su ile nemlendirilmiş büyük bir pamukla silinerek alınır.
- b) Laboratuarda yapılacak kimyasal deney ve bakteriyolojik muayeneler için 500 g - 1.000 g ağırlığındaki kesilmiş parçalar, mümkün olduğunda, daha önce kesilmiş olan bir yerden ve ete en az zarar verecek biçimde alınmalıdır.
- c) Kemik seviyesinde, deride oluşan kokuşmaların nedenlerini anlamak amacı ile yapılacak bakteriyolojik muayeneler için derin kas numuneleri, karkasın bozulma görülen kısmından paslanmaz çelik, steril bir myectomy ile veya dondurulmuş etlerde matkapla alınmalıdır.
- d) Yağ numuneleri mümkün olduğunca böbrek yağından alınmalıdır.

Şüpheli üzerine satış yerlerinden örnek alınırken kaide olarak et numunelerinden tam durumdaki bir adedi alınır. Bir paralel örneğin de soğukta korunmak üzere "şahit numune" olarak ayrılması gerekir.

Örnekler bir tutanakla laboratuara sevk edilir. Bütün halindeki örnek parşömen kağıdına veya selofan folyaya sarılarak gönderilmelidir. Bu amaçla polietilen folya veya tabakalardan da yararlanılabilir. Örnekler; Mümkün olduğu kadar steril koşullarda alınmalıdır. (steril pens, makas, cam kavanozlar)

Alınan et ürünü örneklerinin en geç 2 saat içerisinde laboratuara ulaştırılması gerekir, gönderme süresinin 2 saati aşacağı durumlarda örneklerin ısı derecesi 4-9°C olan termos, çanta veya kutularda taşınması veya gönderilmesi sağlanmalıdır. **(Kaynak 1)**

HİSTOLOJİK MUAYENELER

ET VE MAMULLERİ – HİSTOLOJİK MUAYENELER

Sucuk, sosis ve salamda, kendi standardının katılmasını yasakladığı iç organ, sıfak, tendo gibi etten başka maddelerin araştırılmasında fiziksel ve histolojik muayeneler yapılır. Histolojik muayene yapılamadığı hallerde kuvars lambası veya maserasyon deneyleri uygulanır.

Araç - Gereç :

- Analitik terazi, $\pm 0,1$ g duyarlılıkta
- Mikrotom
- Porselen kap, ortası çukur
- Mikroskop
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayıraç ve Çözeltiler :

- Formalin çözeltisi, % 10'luk
- Eter
- Erlich'im asit hematoxilen çözeltisi
- Hidroklorik asit çözeltisi, seyreltik
- Eosin çözeltisi, % 10'luk
- Alkol, % 96'lık
- Ksilol
- Kanada balzamu

İşlem :

Numunenin çeşitli yerlerinden olmak üzere en az 125g alınır. Bu numunelerden yüzeyi 1 - 3 ve derinliği 5 mm olan parçalar kesilir. Bu parçalar % 10'luk formalin çözeltisinde 12 ila 24 saat tespit edilmek üzere bırakılır.

Çok yağlı numuneler önce eterden geçirilerek yağı alınmalıdır. Formalin çözeltisinde tespit olunan parçalar çıkarılır. Ağzı delik mantarlı bir kaba konarak bol su ile yıkanır. Bu maksatla kap 2 saat kadar su altında tutulur ve parçalar jilette düzeltilerek dondurma mikrotomunda dondurulur.

Mikrotomda 10 - 12 mikron kalınlığında olmak üzere kesilir ve bu kesitler ya damıtık su veya kaynatılmış ve soğutulmuş suya atılır. Sonra boyamaya geçilir.

Boyama;

3 adet ortası çukur porselen kap alınır. Birine Erlich'in asit hematoksilen çözeltisi, diğerine adi su, üçüncüsüne de seyreltik hidroklorik asit çözeltisi konur. Sudan alınan kesit önce hematoksilen içine atılır ve burada yaklaşık olarak 8 dakika tutulur. Buradan çıkarılarak içinde su bulunan ikinci kaba konur ve yıkanır. Sonra içinde seyreltik hidroklorik asit olan kaba konur, rengi çıkmayınca kadar deklöre edilir. Buradan içi su ile dolu cam kaplara alınır. En az iki saat suyu değiştirilmek suretiyle yıkanır.

Kesit buradan alınarak % 10'luk Eosin çözeltisi içine atılır, iki dakika boyanır. Buradan çıkarılarak 96°C'lik alkolde deklöre edilir. Tekrar suya alınır. Daha önceden iyice yağı giderilmiş lam, suya daldırılarak bir ince fırça veya öze yardımı ile kesit, lam üzerine alınır. Kurumaya bırakılır. İyice kuruduktan sonra ksilol'e daldırılıp çıkarılır, ıslak iken üzerine bir damla Kanada balzamu konur ve arada hava kalmayacak şekilde üzerine lamel konarak kapatılır, kurumaya bırakılır ve sonra daldırma mikroskop altında dokuların durumu incelenerek içinde iç organlar olup olmadığı tespit olunur. **(Kaynak 2)**

SEROLOJİK MUAYENE**ET VE MAMULLERİ – SEROLOJİK MUAYENE**

Etin hangi hayvan türüne ait olduğunu tespit etmek için serolojik muayene yapılır. Ayrıca mikrobiyolojik muayenede sonuç alınamayan hallerde de aglutinan serumlarla serolojik muayeneye baş vurulur. Etin türünü tespit için yapılacak serolojik muayenede çöktürme (precipitation) deneyi uygulanır.

I. YÖNTEM : Çöktürme Deneyi ile Serolojik Muayene

Araç ve Gereç :

- Etüv; 37°C'ye ayarlanabilen
- Askoli tüpleri
- Porselen havan
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayırarç ve Çözeltiler :

- Çeşitli hayvan etlerine karşı hazırlanmış çöktürücü (presipitan) serumlar.
- Tuzlu su (serum fizyolojik) veya steril damıtık su; % 0,9'luk steril
- Steril kum

İşlem :

Yağlarından iyice ayrılmış olan 30 g kadar numuneye 50 ml steril tuzlu su katılarak küçük parçalara ayrılincaya kadar dikkatle steril porselen havanda bir miktar steril kumla ezilir. Bir gece buzdolabında bırakılır.

Duruma göre iki saat 37°C'lık etüvde bırakılmak suretiyle aynı sonuç elde edilir. Ertesi gün ezilen numune pamuk, süzgeç kağıdı veya asbestten süzülerek berraklaştırılır. Bu süzütünün kullanılmağa elverişli olup olmadığı, 1ml'lik süzüntüye % 1'lik nitrik asit çözeltisinden ve sulfosalisilik asitten bir iki damla damlatılarak anlaşılır, hafif test için yeteri derecede proteinli maddelerin geçtiğini gösterir. Süzüntü nötr olmalıdır, değilse sodyum hidroksit çözeltisi ile nötr hale getirilmelidir.

Reaksiyon ASKOLİ tüplerinde uygulanmalıdır. Tüp bulunmadığı tüp bulunmadığı takdirde ucu çekilmiş pastör pipeti de kullanılabilir. Askoli tüpüne önce süzüntüden daha sonra dikkatle 0,05 ml anti - serumlardan katılır. Tüpler 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Süzüntü ile antiserum arasında oluşan beyaz halka, kullanılan seruma ait etin bulunduğunu gösterir. Denemede kullanılacak olan serumlar 1/1000 - 1/10.000 - 1/20.000 duyarlı olmalıdır.

Şarbon aranmasında aynı deney uygulanır, ancak burada kullanılacak serum, şarbona karşı hazırlanmış antipresipiten serumdur.

II. YÖNTEM : Agglutinasyon Deneyi ile Serolojik Muayene

Salmonella, Coli, Brucella, Proteus, Paratifo A, Paratifo B ve benzeri patogen mikroorganizmaların tespitinde bu mikroplara karşı hazırlanmış özel agglutinan serumlar kullanılarak yapılacak serolojik muayenede agglutinasyon deneyi uygulanır.

Araç - Gereç :

- Lam
- Öze
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayırarç ve Çözeltiler :

- Agglutinan Serumlar

İşlem :

Şüpheli mikrop kolonisi çok az bir miktar fizyolojik tuzlu su ile karıştırılır, bundan bir öze dolusu alınarak lamın bir köşesine konur. Bunun yanına agglutinan serumdan bir damla ilave edilir ve öze yardımı ile iyice karıştırılır.

Lam elde tutularak devir hareketleri yapılır. 1 - 2 dakika içinde topaklaşmalar görülürse, agglutinasyon müspettir, hangi mikrobun agglutinan serumu kullanılmışsa o mikrop üremiş demektir. (**Kaynak 2**)

DUYUSAL MUAYENE

Burada etlerin fiziki vasıflarından bahsedilecektir.

Etin Rengi: Soluk, hafif kırmızı ve koyu kırmızı arasında farklar gösterir. Etin rengi, hayvan nevelerine göre farklı olduğu gibi, aynı neviye ait hayvanlarda da verilen yeme, hayvanın dişiliğine, erkekliğine, yaşına göre de farklılıklar gösterir. Etin rengi, adale primitif fibrinlerinin havi olduğu hemoglobin miktarına bağlıdır. Etin renkli maddesi kimyevi olarak hemoglobinin aynıdır. Fakat bu madde ette, adale fibrinlerinin myonisi ile birleşmiş bir halde bulunur. Bu tarzda etin az çok kırmızı renkte görülmesinde tesiri vardır. Etteki hemoglobin miktarı, adalelerin çalışmaları nispetinde fazladır. Bunun için uzviyet içerisinde en koyu olanlar kalp ve diyafragma kaslarıdır. Tavşan ve tavuklarda, yaşadıkları müddetçe etler soluk renktedir. Kasaplık hayvanların etleri ise, süt emdikleri devrede az çok beyaz soluk kırmızı renktedir. Sütle semirtilen danaların etleri, hemen hemen altıncı aya kadar beyaz renkte görünürler, bunların yağları da çok beyazdır. Genç ineklerin ve öküzlerin etleri açık kırmızı renktedir. Boğaların etleri ise, hemoglobinin fazlalığı dolayısıyla koyu kırmızıdır. Mezbahada veya dışarıda kesilen hayvanlarda etlerin fazla kanlı bulunması, bir hastalık neticesinde kalp faaliyetinin azalarak kesim esnasında kanın iyi akmadığına delalet eder.

Etin ve yağın evsafı üzerinde yemin de büyük tesiri vardır. Fazla miktarda balıkla beslenen domuzlarda, ette balık yağı kokusu ve lezzeti görülür. Sığırlar fazla miktarda ve uzun zaman yağ fabrikaları küspeleriyle beslendikte, etlerinin ve yağlarının fiziki evsafı ve

kimyevi terkipleri dolayısıyla da lezzeti üzerinde kötü tesirler hissedilir. İyi lezzetli bir et merada beslenen hayvanlardan elde edilir.

Etlerin koku ve lezzeti de kasaplık hayvan nevine has olmak üzere hususiyetler gösterir. Eterde ahır ve süt kokusu duyulabilir. **(Kaynak 6)**

FİZİKSEL MUAYENELER

a- pH değerinin ölçümü

Elektro pH metreler kullanılarak yapılır. Laboratuara gönderilen etler ve et ürünlerinden hazırlanan homojenizatta pH değeri ölçülür. Üretim yerlerinde ise genellikle portatif pH metreler kullanılarak doğrudan doğruya ürün üzerinde ölçümler yapılır. (Resim 1)

Örneğin hazırlanması: Et ürünü yüksek devirli homojenizatörler (Ultra-Turrax) kullanılarak homojenize edilir. Homojenizattan uygun bir miktar temiz bir behere aktarılır. Behere alınan homojenizatın pH metrenin elektrotlarını örtecek yükseklikte olması gerekir.

Elektro pH metrenin ayarlanması: Isı derecesi ölçümün yapıldığı yerin sıcaklığına yakın olan tampon solüsyonuyla pH metre ayarlanır.

Ölçüm: pH metre, homojenizatın ısı derecesine göre ayarlanır. Ayar düğmesi bulunmayan modellerin kullanılması halinde, örneğin ısı derecesi 20'C'a ayarlanır. En az iki ölçüm yapılarak ortalama değer esas olarak alınır.

Elektrodun temizlenmesi: İkinci bir ölçüme geçilmeden önce pH metrenin elektrodu % 96'lık etil alkol veya su ile doyurulmuş dietil eterle silinerek temizlenir ve destile su ile yıkanır. Elektrod doymuş potasyum klorür eriyiğinde tutularak korunmalıdır. Birleşik elektrotların ise destile suya daldırılmış durumda bekletilmesi gerekir.

Portatif pH metrelerle yapılan ölçümde ise özel kılıf içerisindeki (korumak) elektrod et ürününe saplanır. Sert yapılı ürünlerde ve cam elektrotların kullanılması halinde, önceden ürüne uygun bir kanalın açılması gerekir. Elektrodun et ürünüyle tam temasını sağlamak için kanalın içersine birkaç damla destile su damlatılmalıdır.

b- Redokspotansiyelin ölçümü

Redüksiyon ve oksidasyon olayında kaide olarak bir proton geçişi söz konusudur. Bu nedenle redokspotansiyel sistemin o andaki pH değerine bağlı kalır. Burada ters bir orantı vardır. Ortamın pH değerinin yükselmesiyle redokspotansiyeli azalır. Buna dayanarak pH değerleri esas alınmak suretiyle bunlara karşı gelen redokspotansiyeli değerleri "rH" ile gösterilmiş ve bir cetvel haline getirilmiştir. Elektrometrik ölçümlerde rH değeri elektrotlar

arasındaki potansiyel farkından hesaplanır. Platin elektrodun doyurulmuş kalomel elektroduna karşı verdiği ölçü değeri E ile gösterilir. Bu değerden yararlanılarak aşağıdaki formülden rH değeri bulunur.

$$rH = \frac{E + 57.73 \text{ pH}}{28.86} \quad (18^\circ\text{C})$$

Redokspotansiyelin ölçümü hassas olarak, doyurulmuş kalomel veya gümüş klorür elektroduyla bağlantılı bir platin elektrod yardımıyla yapılır. Elektrodlar arasındaki gerilim, bir gerilim ölçme aletiyle belirlenir. Ölçüm sırasında ortamda oksijen bulunmamalıdır. Oksijenin iz halinde mevcudiyeti bile sonucu etkiler. Platin elektrod bir süre HCl'de tutulur ve alevde yakılır. Platin elektrodun yüzeyi yeterince geniş olmalıdır. Aksi halde potansiyel ayarlaması yavaşlar. Sabit bir potansiyelin sağlanması çoğunlukla birkaç saat sürer.

Redokspotansiyel, pH ölçümlerinde kullanılan indikatörlerden yararlanılarak da ölçülebilir. Burada elektrometrik ölçümde olduğu gibi ortama oksijen girmemelidir. İndikatörlerin eriyik şekilleri dayanıksız olduğundan her ölçüm için taze hazırlanmaları gerekir. (İnal,1990).

c- Su aktivitesi değerinin (a_w) ölçümü

Su aktivitesi deyimini altında üründeki toplam suyun kimyasal veya fiziksel biçimde bağlanmış olan kısmı veya ortam suyunun buhar basıncının doymuş buhar basıncına bölünmesiyle elde edilen değer anlaşılır.

Et ürünlerinde bulunan mikroorganizmaların çoğunluğu ortamdaki serbest su sayesinde yaşamlarını sürdürürler. Bunun gerçekleşebilmesi için besin maddesinin su aktivitesi değerinin (a_w) mikroorganizmaların metabolizma faaliyetlerine imkan verecek düzeyde olması gerekir. Bu nedenle a_w değerinin ölçümü besin hijyeninde önem taşır. Su aktivitesi 0.0 ile 1.0 arasında değişen rakamlar halinde ifade edilir. Çeşitli tuzları ve çözünebilen diğer maddeleri içermeyen destile suyun su aktivitesi değeri 1.0'dır Tamamen kuru, yani su içermeyen bir gıda maddesinin a_w değeri ise 0.0'dır.

Et ürünlerinin su aktivitesi değeri uygulanan tuzlama, kurutma, dondurma gibi teknolojik işlemlerle azaltılır.

Mikroorganizmalar tarafından kullanılan su miktarı, yani a_w değeri aşağıdaki formülden bulunur.

$$a_w = \frac{P}{P_s}$$

P : Üründeki su basıncı

PS : Doymuş buhar basıncı (en yüksek düzeydeki su buharı basıncı)

Özellikle olgunlaşma döneminde bulunan fermente sucuklara uygulanan a_w değeri ölçümleri önceleri klasik metodlarla yapılmıştır. Günümüzde gelişmiş olan cihazlarla seri ölçümler yapılabilmektedir. (**Resim 2**)

d- Ultraviyole ışığı altında inceleme

Özellikle fermente sucuklardan hazırlanan kesitler dalga uzunluğu 250-285 milimikron arasında değişen quartz lambası altında tutularak ultraviyole ışığında gösterdikleri flüoresans ve renk değişimleri açısından değerlendirilirler. Bu yöntemle sucukta mevcut belirti doku parçaları hakkında bir fikir edinmek mümkündür.

Bağ doku, kıkırdak ve kemik parçaları kuvvetli mavimsi beyaz, tendo ve fascia parçaları beyazdan mavimsi beyaza kadar değişen bir flüoresans verirler. Yağ dokusuna ait kısımlar flüoresans oluşturmaz. Ancak gri beyazdan gri menekşeye kadar değişen bir renkte görülürler. Et ve akciğer parçaları soluk kırmızısı bir renkte fark edilir, fakat birbirlerinden ayırt edilemezler.

Bir değerlendirmenin yapılabilmesi için çok sayıda kesit incelenmeli ve edinilen kanaat "bol miktarda", "az miktarda" veya "çok az miktarda" şeklinde ifade edilmelidir.

(**Kaynak 3**)

KİMYASAL MUAYENELER

Numune Alma ve Homojenizasyon

Tam bir analiz neticesi almak için, numunenin homojen şekilde karışımının sağlanması şarttır. Bu durum numunenin homojenize edilme derecesi ile yakından ilgilidir. Bazen mamul madde üretiminde tanı veya tama yakın bir yeknesaklık elde edilebilmektedir. Bu gibi maddelerden alınan küçük bir numuneden oldukça güvenilir analiz neticeleri alınabilir. Her şeye rağmen, numunenin tam bir homojenizasyonun sağlanması gerekir. Homojenizasyon, numunenin yapısına göre bagetle olabildiği gibi, 3 kere kıyım makinesinden çekilmekle veya bir mixer yardımıyla da olabilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta numunenin yüksek devirde dönen bıçaklar arasında ısınmadan dolayı

suyunu kaybetmemesinin sağlanmasıdır. Özel durumlarda, donmuş halde bulunan numunelerin homojenize edilmelerinde kullanılan kıyma makineleri bıçaklarının da soğutulmaları gerekmektedir.

Homojenize edilen numune, hemen ağzı kapanan kaplara konarak işlemleri yapılmasına kadar buzdolabında saklanması gerekmektedir. Bu sırada, sıvı numunelerin sulu kısımları ayrışabilir. Bu durumun önüne geçmek için, buzdolabından çıkan numune kabının çalkalanması yeterlidir.

Gıda Maddeleri Mevzuatının 182. maddesi muayene ve tahlil için alınan sucuk numunesi miktarını en aşağı 150g. olarak saptamaktadır. **(Kaynak 4)**

KİMYASAL MUAYENELER

1- BAĞLAYICI DOKU TAYİNİ

ET VE MAMÜLLERİ – BAĞLAYICI DOKU TAYİNİ

Araç – Gereç:

- Analitik terazi; 0.1 gr. duyarlıkta
- Süzgeç kağıdı
- Genel laboratuvar araç gereçleri

İşlem :

Deney numunesinden 50 gr alınır, soğuk su ile 3 - 4 saat maserasyon işlemi uygulanır, süzülür. Süzgeç kağıdının üstünde kalan kısım bir behere konarak su ile kaynatılır. Bağlayıcı dokular eridikten sonra süzülür. Süzüntü litreye tamamlanır. Bundan belli bir miktar alınarak kjeldahl ile azot tayin edilir. (Kod No: 166.04) Bulunan azot miktarı 5,55 ile çarpılarak bağlayıcı doku protein miktarı bulunur. Toplam Protein miktarından, bağlayıcı doku protein miktarı çıkarılarak numunedeki hazmolabilir protein yüzdesi bulunur. **(Kaynak 2)**

2- ET ÜRÜNLERİNDE BOYA MADDELERİNİN BELİRLENMESİ (BGA(x) Standard Metodu)

a. Uygulama alanı

Metod, gıda renk maddelerinin et, fermente ve ısı işlemi görmüş et ürünlerinden separasyonu, purifikasyonu ve identifikasyonu amacıyla uygulanır.

b. Prensiip

Metod, örnekteki renk maddesinin bir solvent'de süspansiyon haline getirildikten sonra elde edilen süzüntünün bir adsorbana emdirilmesi ve purifiye edilen adsorbandan ince tabaka kromatografisi veya spektral fotometri ile identifiye edilmesi esasına dayanır.

c. Araç ve gereçler

Renk maddelerinin izolasyonunda kullanılanlar:

- Mikrokromatografi boruları (iç çaplar 8, 10, 25 mm, 3 mm x 100 mm ölçülerinde bir çıkış borusuyla donatılmış, toplam uzunluk 250 mm).
- Cam pamuğu
- Soxhlet ekstraksiyon apareyi
- Su hamamı
- Rotasyon buharlaştırıcısı
- Blendır
- Porselen havan
- Etüv

Renk maddelerinin identifikasyonunda kullanılanlar:

- İnce tabaka kromatografisi için komple teçhizat
- Hazır selluloz plakları Kieselgel hazır plakları
- Spektrofotometre

d. Kimyasal maddeler

Renk maddelerinin izolasyonunda kullanılanlar:

- Kolon kromatografisi için toz halinde poliamid
- Yün iplikler
- Deniz kumu (arındırılmış)
- Selit
- Asetik asit (%10'luk)
- Amonyak solüsyonu (%5'lik)
- Metanol
- Etanol
- Petroleter (kaynama derecesi 40-60°C arasında)
- Aseton
- Dimetilformamid
- Kloroform
- Diklormetan

- Elusyon karışımı (%25'lik metanol'le hazırlanmış amonyak solüsyonu, hacmen 5 + 95 kısımdan oluşmak üzere)
- Akışkan karışımı (25 g/L trisodyum sitrat-dihidrat solüsyonu, amonyak solüsyonu, amonyak solüsyonu ve %25'lik metanolden hacmen 80 + 20 + 12 oranında hazırlanmış)

Yağda eriyenrenk maddeleri için akışkan karışımı (kloroform ve metanolden hacmen 20 + 80 oranında hazırlanmış)

e. İşlem

Renk maddelerinin izolasyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi

- Mikrokromatografi borusunun hazırlanması:

Mikrokromatografi kolonunun alt kısmı az miktarda cam pamuğu ile kapatılır ve konik kısmını kaplayacak kadar deniz kumu ile doldurulur. Sonra pozisyonuna getirilir ve alt kısmına bir toplama beheri yerleştirilir

Mikro kromatografi kolonunun çapı kullanılacak örneğin miktarına ve bu örnekten elde edilmesi tahmin edilen renk maddesinin oranına göre seçilmelidir. Renkli görünüm veren et ürünlerinde çapı dar borular tercih edilir. Renk maddelerinin purifikasyonu için de yine çapı küçük boruların kullanılması gerekir.

Yün ipliklerin hazırlanması:

Yün, soxhlet cihazında petroleter kullanılarak 25-30 sirkülasyonla yağdan arındırılır. Havada iyice kurutulduktan sonra büyük bir beherde %25'lik etanolle hazırlanmış amonyak solüsyonuyla 1 saat muamele edilir. Bu sırada beher ısıtılır ve içerik sık sık karıştırılır. Sonra suda yıkanır ve bir gece boyunca cam çubuklara asılmış durumda kurutulur.

f. Renk maddesinin ısı işlemi görmüş et ürünlerinden separasyonu

Örnek blendırda ufalanır ve homojenize edilir. Bundan alınan 10 g'lık kısım 3 g deniz kumu ve 3 g selit ile havanda iyice karıştırılır, yağ ve suyun uzaklaştırılması için 3-4 kere her defasında 30-40 ml kadar aseton sarf edilmek üzere ezilir. Aseton her defasında dekante edilir ve içinde herhangi bir şekilde yağda eriyen renk maddesi yoksa, atılır. Asetonda yağda eriyen renk maddeleri kalmışsa, aseton destile edilir ve elde edilen kalıntı petroletere alınarak işlenir.

Yağda erimeyen renk maddelerini ayırmak için muamele edilen örneğe ait kısım mevcut olabilecek asetonun uzaklaştırılması amacıyla 30 dakika 90'C'a ayarlı kurutma dolabında bekletilir. Dolaptan çıkarılan örnek yeniden iyice ezilerek toz haline getirilir, hazır durumdaki mikrokromatograf borusuna doldurulur. Renk maddesini proteinden ayırmak için elusyon karışımından her defasında 5'er ml'lik miktarlar toz halindeki kütle üzerine dökülür.

İşleme dışarı alınan eluatın rengi kayboluncaya kadar devam edilir. Alınan eluat asetik asitle asitlendirilir, su ile hacminin üç misline kadar inceltirilir. Sonra üzerine 0.5 ile 1g kadar poliamid tozu konulur. Poliamidle muameleden sonra bazen eriyiğın renkli kaldığı görülebilir. Bu durum tabii renk maddelerine bağlıdır. Eriyik 60°C'a kadar ısıtıldıktan sonra önceden hazırlanmış yün ipliğine adsorbe ettirilebilir.

g. Renk maddesinin fermente et ürünlerinden separasyonu

Örnekten ayrılan 50g'lık parça blendorda ufalanır, homojenize edilir ve kurutma dolabında 60°C da bir gece boyu kurutulur. Kuru kütle Soxhlet ekstraktöründe diklormetanla yağından arındırılır (yakl. 20 sirkülasyon). Bazen diklormetan ekstraksiyondan sonra boyanır. Nedeni tabii renk maddeleridir. Soxhlet cihazından alınan kartuş açılarak içeriği bir behere aktarılır, artan eritici buharlaştırılır. İçerik 150 - 200 ml kadar amonyak solüsyonuyla 2-3 dakika kaynatılır ve sıvı kısım dekante edilir. Ekstraksiyon işlemi her seferinde 50 ml amonyak solüsyonu kullanılmak suretiyle 2 defa tekrarlanır. Ekstraktın asetik asitle asitleştirilmesinden sonra 0.5 - 1 g poliamid tozu ilave edilir. Koşnil renk maddesinin poliamidle reaksiyona girmesini önlemek için purifikasyon ve desorpsiyon işlemlerinin süratle yapılması gerekir.

Adsorpsiyon, eriyiğın ısıtılmadan veya 60°C'a kadar ısıtıldıktan sonra önceden hazırlanmış yün iplikleriyle gerçekleştirilebilir.

h. Poliamid metoduyla saflaştırma ve zenginleştirme

Adsorbe edilmiş renk maddesiyle poliamid tozunu içeren süspansiyon iyice çalkalandıktan sonra sıcak olarak (yakl. 60°C) önceden hazır vaziyete getirilmiş kromatografi borusuna aktarılır, 20 ml kaynar su ile 6 defa ve 5 ml metanol ile 3 defa elue edilmek suretiyle şeker ve asitlerden arındırılır. Renk maddelerinin elusyonu için elusyon karışımı birkaç kere 5 ml'lik miktarlar halinde kolona verilir. İşleme elusyonun tam oluşmasına kadar devam edilir. Çoğunlukla küçük miktarlar halinde tabii renk maddeleri de birlikte elue edilir. Fakat bu tabii renk maddeleri, sentetik renk maddelerinin belirlenmesinde bir engel teşkil etmezler. Renk maddelerinin dekompoze olmasını önlemek için eluat asetik asitle asitleştirilir. Elusyonda cüzi renk maddesi konsantrasyonlarını içeren büyük sıvı kitlelerinin oluşması halinde, poliamid tozuna yeniden adsorpsiyon yapılarak zenginleştirme (yoğunlaştırma) sağlanır. Ancak burada az miktarda poliamidle (yak. 0.2 g) çalışılmalıdır. Zenginleştirme işlemi aynı zamanda reaksiyonu bozan maddelerin ayrılmasını sağladığından elue edilmiş renk maddelerinin ikinci, hatta üçüncü bir adsorpsiyona tabi tutulmasında yarar vardır. Asit karakter kazanmış olan eluat bir su banyosunda veya rotasyon buharlaştırıcısında yoğunlaştırılır.

i. Yün ipliği metoduyla saflaştırma ve zenginleştirme

Şekerleri ve fenollü maddeleri içeren et ürünlerinin kullanılması halinde, renk maddelerinin başka bir maddeye aktarılması saflaştırma açısından avantaj sağlar: Yüne çektirilmiş renk maddeleri zayıf amonyak solüsyonunda, gerekirse biraz detanol katılarak su banyosunda yünden çözülerek alınırlar. Sonra eriyik buharlaştırılır ve geri kalan kısım sulandırılıp asitlendirilir ve renk maddesi yeniden yüne emdirilir. Boyanan yün iplikler tekrar su ile yıkanır ve belirtildiği şekilde çözülerek ayrılır. Eluat'ın reaksiyonu asit değilse, asetik asitle asidik hale getirilir. Sonra su banyosunda veya rotasyon buharlaştırıcısında yoğunlaştırılır.

j. Yağda eriyen renk maddeleri için spesifik poliamid metodu

Renk maddesini içeren petroleter solüsyonu 3 defa 30'ar ml dimetilformamid ile çalkalanır. Sonra dimetilformamid'li ekstraktlar iki defa 10'ar ml petroleter'le çalkalanır. Böylece ekstrakt içinde bulunabilecek yağ uzaklaştırılır. Müteakiben dimetilformamid eriyiği aynı hacimdeki su ile seyreltilir ve ortamda bulunabilecek petroleter vakum altındaki rotasyon buharlaştırıcısında destilasyonla ayrılır.

Dimetilformamid eriyiğinin bir bölümü hazır hale getirilmiş mikrokromatografi borusuna verilir. Sonra birkaç defa su ile yıkanır ve laktoflavin'in kısmen elue edilmesi sağlanır. Hemen sonra yaklaşık 15 ml metanol'le yıkanır. Bu suretle laktoflavin ve serez kırmızısı elue edilir. Müteakiben 20 ml kloroform ve 13 ml elusyon karışımı ile desorbe edilir. Burada kloroform β - karoten'i, elusyon karışımı ise biksin ve kurkumayı elue eder. Fraksiyonlar ayrı ayrı alınır, vakum altında dikkatle yoğunlaştırılır ve renk maddesi ince tabaka kromatografisiyle identifiye edilir.

k. İdentifikasyon

Koyulaştırılmış eluat'ın içerdiği renk maddeleri ince tabaka kromatografisiyle ve gerekirse spektrofotometrik olarak identifiye edilirler.

Eluatın akışkan karışımı kullanılarak şerit şeklinde (bandlar halinde) aplikasyonu yapılan separasyonda hazır selluloz plaklar iyi sonuçlar verir. Kaide olarak en iyi ayırım, eluatın start noktasına renk maddesinin farkedilebileceği kadar bırakılmasıyla sağlanır. Kesin bir hüküm verilebilmesi için farklı hacimlerdeki eluatın applike edilmesi gerekir. Çünkü renk maddelerinin karışımdaki oranları değişik olabilir. Kromatogram üzerinde "uç" tabir edilen çıkıntılarının oluşması, reaksiyonu bozan maddelerin varlığından ileri gelir. Yeniden yapılacak adsorpsiyon, kaynar su ile yıkama ve bunu izleyen desorpsiyonla bu hatayı gidermek mümkündür.

Renk maddelerinin kati identifikasyonu; varlığı tahmin edilen renk standartlarının da örneklerle birlikte kromatograma aplike edilmesiyle yapılan kromatografi ile mümkündür. Eluat ve standartlar kromatograma nokta veya band şeklinde aplike edilirler. Şüpheli durumlarda eluata ait renk maddelerinin su ve etanol ile elue edilmesi gerekir. Absorpsiyon spektrumlarının identifikasyonu, standart renk maddelerinin spektrumlarıyla karşılaştırılmak suretiyle bulunur.

İdentifikasyonda yağda eriyen renk maddeleri söz konusu ise, ayırım akışkan karışımı kullanmak suretiyle kieselgel hazır plaklarında gerçekleştirilir. **(Kaynak 3)**

3. HAM SELÜLOZ (HAM LİF) TAYİNİ

ET, KEMİK UNU, BAHARAT – HAMSELÜLOZ TAYİNİ

Yöntemin İlkesi : Numunenin örtücü çözelti ile (asetik bir karışım) örtülerek, ısıtılması, kalıntının asetik asit ile muamele edilmesi, sıcak su ile yıkandıktan sonra değişmez ağırlığa kadar ısıtılarak tartılması, kalıntının küllendirilmesi, kül kısmının tartıdan çıkarılarak; geriye kalan ağırlığın bulunması ilkesine dayanır.

Araç - Gereç :

- Analitik terazi $\pm 0,001$ g duyarlıkta
- Etüv, $105 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulabilen
- Kül fırını $525 \pm 25^\circ\text{C}$ 'de tutulabilen
- Dik soğutucu
- Beher, 100 ve 200 ml'lik
- Erlen, 100 ve 200 ml'lik
- Pipetler, 5, 10 ve 25 ml'lik
- Cam huni
- Süzgeç kağıdı
- Kaynatma balonu, 250 - 300 ml'lik
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayrıraç ve çözeltiler :

- Örtücü çözelti; 70 ml % 70'lik, asetik asit, 5 ml derişik nitrik asit ve 2 g triklorasetik ile hazırlanır.
- Asetik asit, % 70'lik
- Etil alkol, % 96'lık
- Eter
- Aseton

- Sıcak destile su

İşlem :

1 g numune tartılır ve kaynatma balonuna konular, üzerine 25 ml örtücü çözelti katılır ve dik soğutucuya bağlanır. 30 dakika doğrudan doğruya kaynatılır, sonra balon alevden geri çekilir, su akımı ile soğutulur, önceden tartılıp darası alınmış bir süzgeçten süzülür. En son damla da süzülünceye kadar beklenir, süzgeç ve balon % 70'lik asetik asit ile bir kez yıkanır ve tamamen süzülünceye kadar beklenir. Alttan süzülen su, tam nötr reaksiyon verinceye kadar, süzgeç ve kalıntı, sıcak destile su ile, sonra üç kez aseton ile yıkanır. Aseton tamamen süzüldükten sonra bir kez de eterle yıkanır. Süzgeç kağıdı dikkatle huniden ayrılır, katlanır ve bir saat camı üzerine yerleştirilir. 105°C'da dikkatle kurutulur ve tartılır. Kuru ve tartılmış kalıntı süzgeç, tartısı belli bir krozeye yerleştirilir, 500 - 550°C'da küllendirilir. İçinde kül bulunan kroze yeniden tartılır.

Sonuç: Ham selüloz % g - A - B

Burada;

A = Kurutulmuş süzgecin selülozla birlikte ağırlığı, g

B = Süzgeç kağıdının önceden bulunan darası, g'dır.

Saf selüloz % g = C - F

Burada;

C = Ham selüloz, g

F = Selülozlu süzgeç, kağıdı ve kroze ağırlığından küllendirmeden sonraki ağırlığın çıkarılması ile elde olunan değer (g) dir. **(Kaynak 2)**

4. HAM PROTEİN TAYİNİ

Yöntem I:

Ham protein tayini 3 aşamadan oluşmaktadır.

- Digestion (Yakma): Bu kısımda proteinde bulunan azot (NH₄)₂ SO₄, haline getirilir.

Organik maddeden 2 g tartılarak Kjeldahl balonuna alınır. Üzerine

Titrasyon: Oluşan NH₃ toplama kabında normalitesi belli standart bir asit ile titre edilir.

$$\% \text{Ham Protein} = \frac{A \times F \times 0.0014}{m} \times 100$$

A = NH₃ tarafından tutulan N/10 luk asitin ml si.

F = Azotu proteine çevirme katsayısı (6.25),

m = Alınan numune miktarı (g).

Yöntem 2:

Bu yöntemde de 3 aşama vardır:

- **Digestion (Yakma):** Homogenize edilmiş 2 g numune tartılır. Üzerine katalizör olarak 15 g K₂SO₄ (susuz) ve 0.5 g CuSO₄ H₂O konur. Kaynama taşı atıldıktan sonra 25 ml derişik H₂SO₄ eklenir. Isı ayarı yapılarak yakılır.
- **Destilasyon:** 40°C ye kadar soğutulan balona 50 ml destile su konur. Karıştırılır ve soğumaya bırakılır. 50(1 ml lik bir erlen içine 50 ml % 4 lük H₃BO₃ (borik çözeltisine 4 damla indikatör konarak karıştırılır). Ve balon adaptörün ağzı sıvıya batacak şekilde yoğunlaştırıcının altına yerleştirilir. Kjeldahl balonunun sıvıya batacak içindekilere aşağıda belirtilen işlemlerden biri uygulanır.
- **Buharla damıtmada:** Kjeldahl balonunun içindekiler damıtma cihazının içine aktarılır ve balon yaklaşık olarak 50 ml su ile çalkalanır. Üzerine 100 ml % 33 NaOH çözeltisi konur. Bu çözelti balona dikkatlice aktarılır. İki tabakanın karışması engellenir. Sonra hemen balon damıtma cihazına takılır. Alkali sıvı kaynayınca kadar içinden buhar geçirilerek ısıtılır ve buna 20 dakika devam edilir. Köpürmeyi azaltmak için balon önce yavaş ısıtılır. Damıtma ürünün hacmi en az 150 ml olmalıdır.
- **Normal damıtmada:** Kjeldahl balonunun içindekiler yaklaşık olarak 300 ml su ile seyreltilir. 15 dakika sonra 100 ml % 33 NaOH dikkatlice balona konur. Karışım sıçramaya başlayınca veya 250 ml damıtma ürünü toplayınca kadar damıtma sürdürülür.
- **Titrasyon:** Erlen içindekiler N/10 HCl ile titre edilir. **(Kaynak 4)**

$$\% = 0.0014 (V1 - V0) \frac{100}{m}$$

V0 = Tanık deney için kullanılan 0.1 NHCl hacmi, (ml)

V1 = Deney numunesi için kullanılan 0.1 NHCl hacmi (ml)

m = Deney numunesinin ağırlığı (g)

Not : Yeni reaktif miktarları veya yeni hazırlanmış çözeltiler kullanıldığında daima tanık bir deney yapılır.

a : Harcanan hidroklorik asit (ml)

m : Örneğin miktarı (g)

Ham protein 100 g örnekte gram olarak miktarı aşağıdaki denklemden hesaplanır :

Ham protein = Toplam azot miktarı x 6.25

5. HİDROKSPROLİN TAYİNİ

a. Prensip

Örnek HCl ile kaynatılarak dekompoze edilir. Hidroksiprolin yağın ayrılmasından sonra kloramin T ile oksitlenir. Oksidasyon ürünü 4-dimetilaminobenzaldehit'le kırmızı renkli bileşikler oluşturur. Bu maddeleri içeren ölçüm solüsyonunun ekstinksiyonu yaklaşık 558 nanometrede ölçülür. Elde edilen değer doğrudan doğruya hidroksiprolin konsantrasyonunu gösterir.

b. Kimyasal maddeler

Analiz saflığında kimyasal maddeler kullanılmalıdır.

- HCl (yakl. 6 N)

- Benzin (kaynama noktası 60-80°C arasında)

- pH değeri yaklaşık 6.8 olan tampon solüsyonu (26 g sitrik asit-monohidrat, 14 g pul halinde sodyum hidroksit ve 78 g susuz asetat yaklaşık 500 ml suda çözündürülür, üzerine kimyasal saflıktaki sodyum etilmerkurittiyosalisilat'dan 100 mg. ilave edilir ve 1000 ml'lik bir balona aktarılır. sonra 250 ml 1-proponal ilave edilerek işaret noktasına kadar doldurulur. Tampon solüsyonu, ışıktan korumak ve 4°C da saklanmak koşuluyla yaklaşık 2 ay dayanır).

- Hidroksiprolin karşılaştırma solüsyonları.

- Hidroksiprolin stam solüsyonu (600 mg/l, kitlesel konsantrasyon)

"Biyokimyasal amaçlı 120 mg L-hidroksiprolin suda çözündürülür. Eriyik 200 ml'lik ölçülü balonda işaret noktasına tamamlanır. Stam solüsyonu doldurulmadan önce 50 mg saf sodyum etilmerkurittiyosalisilat'la konserve edilebilir". Bu ana solüsyondan alınan 5 ml'lik kısım 500 ml'lik bir ölçü balonuna pipete edilip su ile işaret noktasına tamamlanır.

- Hidroksiprolin standart solüsyonları (Yukarıda belirtildiği gibi seyreltilmiş hidroksiprolin stam solüsyonundan 10, 20, 30 ve 40 ml'lik kısımlar 100 ml'lik ölçü balonlarına pipete edilirler. Her seferinde 30 mg sodyum etilmerkurittiyosalisitat ilavesinden sonra işaret noktasına tamamlanırlar. Bu standart solüsyonların konsantrasyonları 60, 120, 180 ve 240 Mg / 100 ml olur).

Standart eriyikler oda sıcaklığında yaklaşık 1 hafta; 4°C da ise 2-3 ay dayanırlar.

- Oksidasyon reaktifi (1.4 g kloramin T tampon solüsyonunun 100 ml'sinde çözündürülür).

ışıktan korunmak ve 4°C da saklanmak kaydıyla yaklaşık bir hafta tazeliğini korur.

- Renk reaktifi (10.0 g 4- dimetilaminobenzaldehit %60'lık perklor asidinin 35 ml'sinde eritilir. Bu çözeltiliye 65 ml 2- propanol yavaş yavaş katılır). Bu çözelti kullanılacağı gün hazırlanmalıdır.

c. Araç ve gereçler,

- Alüminyum veya plastik folyalar
- Balon veya erlenmeyer (100 ml kapasiteli, su veya hava ile soğutulan geri soğutucu ile donatılmış).
- Elektrikli ısıtıcı (ayarlı saatle birlikte)
- Cam huni (yaklaşık 100 mm çapında)
- Katlanmış filtre (18.5 cm çapında)
- Erlenmeyer balonu (dar boyunlu, 500 ml kapasiteli)
- Termostatlı su banyosu (60'C'da sabit kalacak özellikte)
- Cam küvetler (kalınlıkları 1 cm)
- Spektrofotometre veya fotoelektrik kolorimetre (Absorpsiyon maksimumu 558 nanometrede olan interferans filtreli)

d. İşlem

Örnek analize alınmadan önce oda sıcaklığında bekletilmeli ve manuel olarak iyice karıştırılmalıdır. En iyisi homojenizatör kullanılmasıdır.

Örnekten tam 4 g tartılarak bir balona veya erlenmeyere (100 ml'lik) alınır. Üzerine 30 ml HCl ve birkaç sünger taşı konulur..Isıtıcı üzerine yerleştirilen balondaki eriyik hafif ısıtılarak kaynama noktasına getirilir ve 8 saat kaynatılır.

Elde edilen hidrolizat su ile kantitatif olarak 500 ml'lik bir ölçü balonuna aktarılır, üzerine 5 ml benzin konulup işaret noktasına kadar su ile doldurulur. Benzin ve içinde çözülmüş olan yağın oluşturduğu tabaka işaret çizgisinin üzerinde yer almalıdır. Balon içeriği iyice çalkalandıktan sonra yağ içeren benzin kitlesi emilerek uzaklaştırılır ve sulu kısım katlanmış filtreden 500 ml'lik bir erlenmeyer'e filtre edilir.

Hidrolizat oda sıcaklığında 1 hafta, buz dolabında 4 hafta saklanabilir.

Hidrolizattan, beklenen hidrokspirolin konsantrasyonlarının 0.6 - 2.4 Mg / ml olacağı şeklinde uygun bir seyreltme hazırlanır. Bu işlem, kaide olarak 10 ml hidrolizatın 250 ml'lik balonda seyreltilmesiyle yapılır. Bu şekilde hazırlanan seyreltiden alınan 4 ml'lik kısım bir tüpe pipete edilir, üzerine 2 ml oksidasyon reaktifi ilave edilir, karıştırılır ve oda sıcaklığında 20 dakika dinlendirilir. Sonra 2 ml renk indikatörü ilave edilir. Tüp iyice çalkalandıktan sonra hemen 60°C daki su hamamına konulur ve 15 dakika kadar tutulur. Sonra akar su altında tutularak 3 dakika soğutulur ve ölçüm yapılınca kadar 1/2 saat oda sıcaklığında bekletilir.

Solüsyonun ekstinksiyonu yaklaşık SS8 nanometrede, kalınlığı 1 cm olan bir cam küvette ölçülür.

Yukarda açıklandığı şekilde bir kör deneyin de birlikte yürütülmesi gerekir. Yalnız burada 4 ml seyreltilmiş hidrolizat yerine 4 ml su kullanılır. Kör deneyde belirlenen ekstinksiyon değerlerinden çıkarılmalıdır.

e. Kalibrasyon eğrisinin çizimi

Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi için seyreltilmiş hidrolizat yerine her seferinde hidrokspirolin standart solüsyonlarının 4 ml'si ile çalışılır.

Bulunan kör değerler ölçülen ekstinksiyon değerlerinden düşülmelidir. Kör değerlerin tespiti ve hidrokspirolin kalibrasyon değerlerinin belirlenmesi işlemi iki defa yapılmalıdır.

f. Değerlendirme

- **Grafik değerlendirmesi:** Standard solüsyonlardan elde edilen ekstinksiyon değerleri (optik dansite) milimetrik kağıt üzerinde bir koordinat sistemiyle hidrokspirolin miktarları karşısında Mg/ml olarak kaydedilirler.

Seyreltilmiş hidrolizatların bilinmeyen konsantrasyonlara halinde kullanılmasında optik dansiteye tekabül eden "x" konsantrasyonları Mg/ml olarak kalibrasyon eğrilerinden okunur.

0.6 Mg/ml'nin altındaki konsantrasyonlar değerlendirilemezler. Çünkü bunun altında kalibrasyon değerlerinin bir eğri ile gösterilmesi imkan dışıdır. Bu durumda tayinin daha yüksek konsantrasyondaki seyreltmeyle tekrar edilmesi gerekir.

- Kalibrasyon eğrisinin hesapta değerlendirilmesi: Kalibrasyon eğrisinin hesaplanması hidrokspirolin standart solüsyonlarıyla yapılan 4 çift ölçü değerine dayalı olarak gerçekleştirilir.

Hidrokspirolin

konsantrasyonu

(Mg/ml)

x 1 0.6

x 2 1.2

x 3 1.8

x 4 2.4

Optik dansite

y 1

y 2

y 3

y 4

g. Hidrokspirolin miktarının hesaplanması

100 g örnekte g olarak mevcut hidrokspirolin miktarı (w) aşağıdaki denklemden bulunur.

$$W = \frac{12.5 \cdot x}{m \cdot V}$$

V: 10 ml hidrolizatın 250 ml'lik balonda su ile inceltilmesinden sonra elde edilen milimetrik hacmi,

x: Seyreltilmiş hidrolizatta Mg/ml olarak hidroksiprolin konsantrasyonu,

m: Tartılan örneğin miktarı (g) (**Kaynak 3**)

6. TOPLAM KREATİNİN TAYİNİ (Schormüller, 1968)

a. Cihaz ve Malzemeler

- Spektrofotometre (500 mm'de ölçüm yapabilen, optik hücresinin boyu 1 cm olan)
- Su banyosu veya otoklav.

b. Reaktifler

- Pikrik asit (pKa) çözeltisi (%1'lik pikrik asit çözeltisi süzülür. 0.1 N hidroklorik asit çözeltisinde çözülür. 250 ml'lik bir ölçülü balona aktarılır ve 0.1 N hidroklorik asit çözeltisi ile işaret çizgisine tamamlanır. Bu çözeltilerden pipetle 10 ml alınıp; 100 ml'lik bir ölçülü balona aktarılır ve suyla işaret çizgisine tamamlanarak standart kreatinin çözeltisi hazırlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bekletilmeden hemen kullanılmalıdır.

Standart kreatin çözeltisinin 1 ml'si, 0.1 mg kreatinin ihtiva eder.

c. İşlem

Analiz için hazırlanmış numuneden 10 g – 25 g (0.1 g hassasiyetle) 150 ml'lik bir beher içine tartılır. Amonyak ihtiva etmeyen 8 ml – 10 ml damıtık su ilave edilir. Daha sonra 50 ml damıtık su ilave edilerek analiz numunesi iyice ezilir. 3'er dakikalık aralıklarla 15 dakika karıştırılır. Çözünmeyen kısmın çökmesi için 2 dakika – 3 dakika bekletilir. Süzgeç kağıdı kullanılarak 500 ml'lik bir ölçülü balona süzülür. Beher içinde kalan kısım; 50 ml soğuk ve amonyak ihtiva etmeyen suyla 3 defa, 25 ml'lik soğuk suyla 4 defa tekrarlanır. Beherde kalan çökelti, süzgeç kağıdına aktarılır ve 10 ml soğuk suyla 3 defa, ölçülü balon içinde yıkanır. Çökeltinin yıkama işi bittikten sonra, ölçülü balon karıştırılır ve işaret çizgisine kadar su ile tamamlanır. 500 ml'lik ölçülü balondaki çözeltilerden 150 ml alınarak 250 ml'lik bir beher içine aktarılır. Beher, kaynar su banyosu üzerinde, arasıra karıştırılarak; çözelti miktarı 40 ml kalıncaya kadar buharlaştırılır. Fenolftaleyn indikatör çözeltisi kullanılarak nötrleştirilir. 1 ml 0.1 N asetik asit çözeltisi ilave edilir ve 5 dakika hafifçe kaynatılır. Oda sıcaklığında soğutulur ve süzgeç kağıdından 250 ml'lik ayrı bir behere süzülür. Birinci beher

4 defa sıcak su ile yıkanarak her seferinde süzgeç kağıdı üzerine aktarılır. Sonra süzgeç kağıdında kalan çökelti yıkanır.

Süzüntü, su banyosunda uçurular ve 5 ml – 10 ml su ile yıkanarak 50 ml'lik ölçülü bir balona aktarılır. 10 ml, 2N hidroklorik asit çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Kaynar su banyosunda 2 saat veya 117 °C – 121 °C'deki otoklavda 20 dakika hidrolize edilir.

Soğutulur ve 10 ml 2 N sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilir. 1 litrelik bir ölçülü balona aktarılır ve ölçülü balon işaret çizgisine kadar suyla tamamlanır, Bu çözeltilerden 5 ml kuru ve temiz 100 ml'lik ölçülü balona aktarılır. 15 ml damıtık su ilave edilir. Aynı zamanda 100 ml lik ölçülü bir balona 20 ml su konularak düzeltme çözeltisi yapılır. 100'er ml'lik ölçülü balonlardan her birine 20 ml pikrik asit çözeltisi ve 2.5 ml 2 N sodyum hidroksit çözeltileri ilave edilir ve 21°C ± 1°C'deki su banyosuna konulup; arasıra karıştırılarak 15 dakika bekletilir. Sonra, her iki ölçülü balon suyla işaret çizgisine kadar tamamlanır. Karıştırılır ve 15 dakika içinde; 1 cm'lik tüpler kullanılarak, düzeltme çözeltisine karşı deney çözeltisinin 500 nm'deki absorbansı ölçülür.

d. Kalibrasyon eğrisinin çizimi

100 ml'lik 11 adet ölçülü balonların her birine 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 0.10 ml standard kreatinin çözeltisi ilave edilir. Her bir ölçülü balon sırasıyla; 0 mg, 0.1 mg; 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg ve 1 mg kreatinin ihtiva eder. Deney çözeltisi için yapılan işlemler aynen uygulanır. Suyla her bir ölçülü balon 20 ml'ye tamamlanır. 20 ml pikrik asit çözeltisi ve 2.5 ml 2 N sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilir. 21°C ± 1°C'deki su banyosunda arasıra karıştırılarak 15 dakika bekletilir. Ölçülü balonlar işaret çizgisine suyla tamamlanır ve 0 mg kreatinin ihtiva eden çözeltiliye karşı 1 cm'lik tüplerde, 15 dakika içinde; 500 nm'de absorbansları okunur. Absorbans, ortamın sıcaklığına göre değişeceğinden 0 mg kreatinin ihtiva eden düzeltme çözeltisi her üç okumada bir değiştirilir.

100 ml çözeltilerdeki kreatinin miktarları apsise, absorbansları ordinata işaretlenerek kalibrasyon eğrisi çizilir. Kalibrasyon eğrisinden, deney çözeltisindeki kreatinin miktarı bulunur. **(Kaynak 3)**

7. KOKUŞMANIN TESBİTİ

ET VE MAMÜLLERİ – KOKUŞMANIN TESBİTİ

I. YÖNTEM: (NESSLER ÇÖZELTİSİ İLE AMONYAK ARANMASI)

Araç - Gereç :

- Petri kutusu
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayıraç ve Çözeltiler :

- Nessler Çözeltisi; 16 g potasyum iyodür, 24 g cıva iyodür, 75 g potasyum hidroksit 560 g suda çözülür.

İşlem :

Bir petri kutusuna muayenesi yapılacak numunedan bir kesit alınarak konur, üzerine Nessler çözeltisi dökülür. Kokuşma varsa portakal renginden koyu portakal - kahve rengine kadar değişen bir renk oluşur.

II. YÖNTEM: (KURŞUN ASETAT İLE HİDROJEN SÜLFÜR ARANMASI)

Araç - Gereç:

- Süzgeç kağıdı; % 10'luk Kurşun Asetat çözeltisine daldırılmış ve kurutulmuş
- Petri kutusu veya tüp
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayıraç ve Çözeltiler:

- Kurşun asetat çözeltisi; % 10'luk

İşlem:

Numune ince olarak kıyılır ve ağzı kapaklı bir petri kutusuna konur. Petri kutusunun kapağı içine % 10'luk kurşun asetatlı süzgeç kağıdı yerleştirilir ve ağzı kapanarak 10 - 15 dakika bekletilir veya kıyılan madde bir tüpe konur. İnce yaprak halinde kesilmiş ve önceden %10'luk kurşun asetat çözeltisine daldırılarak kurutulmuş süzgeç kağıdı tüpe daldırılır ve bir ucu tüpün kenarına gelmek üzere ağzı bir tıkaçla sıkıca kapanır ve beklenir. Kağıt üzerinde beliren siyah renk, kokuşma olduğunu gösterir.

III. YÖNTEM: (AMONYAK TAYİNİ)

Araç - Gereç:

- Soğutucu
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayırar ve Çözeltiler:

- Karbontetraklorür
- Sülfürik asit (H₂SO₄); 1/100'lük

İşlem: 10 g numune bir balona konur üzerine, örtünceye kadar karbontetraklorür ilave edilir. Bu balon bir ucunda 1/100 H₂SO₄ bulunan bir soğutucuya bağlanır. Kjeldahl yöntemi ile amonyak tespit ve doze edilir.

100 g da 33 mg amonyak bulunması halinde numune kokmuş sayılır.

Sonuç:

$$\text{Amonyak miktarı} = \frac{(aN_1 - bN_2) \times 0,017}{M} \times 100$$

Burada;

A = H₂SO₄ hacmi

B = NaOH hacmi

N1 = Sülfürik asidin normalitesi

N2 = Sodyum hidroksitin normalitesi

M = Numune miktarı g ,

0,017 = 1 ml N H₂SO₄ tarafından tutulan amonyak, g olarak (**Kaynak 2**)

8. ET VE MAMULLERİ - KÜL TAYİNİ

Yöntemin İlkesi: Et ve et mamullerinin magnezyum asetat çözeltisi katılarak bir su banyosu üzerinde kurutulması ve 550 - 600°C sıcaklıktaki bir kül fırınında yakılması, soğutulması ve katılan magnezyum asetat çözeltisinden oluşan magnezyum oksit miktarının çıkarılması sonucu elde olunan kalıntının tayini ilkesine dayanır.

Araç - Gereç:

- Et kıyma makinesi; laboratuvar tipi, delik çapları 4 mm'yi geçmeyen bir ayırıcısı olan, etüv sıcaklığı ayarlanabilen
- Kül fırını, 550 - 600°C'ye ayarlanabilen
- Su banyosu
- Desikatör, etkili bir kurutucusu olan.

- Analitik terazi, $\pm 0,0001$ g duyarlıkta
- Porselen kroze
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayıraç ve Çözeltiler:

Magnezyum asetat çözeltisi; yaklaşık 150 g/L.

15 g susuz magnezyum asetat $Mg (COOCH_3)_2$ veya 25 g magnezyum asetat tetrahidrat $Mg (COOH_3)_2 \cdot 4H_2O$ suda çözülür ve 100 ml'ye seyreltilir, 1 ml çözeltideki magnezyum oksit miktarı hesaplanır.

İşlem: Numune en az iki kez kıyma makinesinden geçirilerek ve karıştırılarak homojen hale getirilir.

Kroze 20 dakika süre ile kül fırınında $550 - 600^\circ C$ 'da ısıtılır. Desikatörde soğutulur ve $0,0001$ g duyarlıkla tartılır.

Hazırlanmış numunedan 5 g kroze aktarılır, düzgün bir şekilde yayılır ve $0,001$ g duyarlıkta tartılır.

Kroze konan numune üzerine 1 ml magnezyum asetat çözeltisi mümkün olduğu kadar eşit şekilde dağıtılarak katılır.

Kroze hafifçe kaynayan su banyosu üzerinde 30 dakika tutulur, sonra bir elektrik ocağı veya bek alevi üzerinde kömürleşinceye kadar sıcaklık artırılarak dikkatle yakılır. Kül fırında beyaz kül elde edilinceye kadar $550 - 600^\circ C$ de yakılır.

Kroze fırından çıkarılarak desikatöre konulur, oda sıcaklığına kadar soğutulur ve $0,0001$ g duyarlıkta tartılır. Külde karbonlaşmış zerreler görülürse kroze tekrar fırına konulur ve 30 dakika daha bekletildikten sonra desikatöre alınır. Tekrar oda sıcaklığına kadar soğutulur ve $0,0001$ duyarlıkla tartılır. Kızdırma işlemi birbiri ardından yapılan tartılar arasındaki fark $0,001$ g'dan çok olmayıncaya kadar tekrarlanır.

Aynı işlemle hazırlanan numune üzerinde paralel iki tayin yapılmalıdır.

Sonuç : Numunedeki kül miktarı (K), ağırlık yüzdesi olarak aşağıdaki formülle hesaplanır :

$$K = (M_2 - M_0 - M_3) \times \frac{100}{M_1 - M_0}$$

Burada;

M_0 = Krozenin ağırlığı, g

M_1 = Deney numunesi ile birlikte krozenin ağırlığı, g

M_2 = Yakma işleminden sonra meydana gelen kalıntı ile birlikte krozenin ağırlığı, g

M_3 = Magnezyum asetat çözeltisi katılarak meydana gelen magnezyum oksidin (MgO)

ağırlığı, g'dır.

Elde edilen sonuçlar arasında uygunluk varsa iki tayinin aritmetik ortalaması sonuç olarak alınır. Sonuç 100 g'lık numunede 0,02 duyarlıkta kül miktarı olarak kaydedilir.

(Kaynak 2)

9. NİTRAT TAYİNİ

Prensip:

Deney numunesindeki nitratın H_2SO_4 , $KmnO_4$ ve Fosfotungustik asit aracılığı ile nitrat okside edilmesi ve oluşan rengin 450 nm'de spektrofotometre de okunması ilkesine dayanır.

Araç ve Gereçler:

- Spektrofotometre
- Destilasyon düzeni
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Kimyasal Çözeltiler:

- M. Ksilenol (2, 4 Dimethylphenol)
- Gümüş amonyum hidroksit çözeltisi (5 gr içinde nitrat bulunmayan Ag_2SO_4 , 60 ml NH_4 , OH da çözülür. Kaynayınca kadar suyu uçurular, soğutulur, su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Bromkresol yeşil belirteci (0.1 N 0.1 gr bromkresol yeşili, 1.5 ml NaOH'da çözülür ve su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Standart nitrat çözeltisi (0.1805 gr KNO_3 1 lt suda çözülür veya 17.85 ml 0.1 N HNO_3 , 1 lt'ye su ile tamamlanır.
- H_2SO_4 çözeltisi (1 hacim asit + 10 hacim su) ve (3 hacim asit + 1 hacim su)
- Fosfotungustik asit %20'lik

İşlem:

5-10 gr. homojenize edilmiş numune 100 ml.'lik behere konur ve üzerine 80 ml.'ik su ilave edilir. İyice karıştırılır. Zaman zaman karıştırılarak su banyosunda iyice ısıtılır. 100 ml.'lik butona alınır ve soğutulur. Soğutulduktan sonra, 100 ml.'ye tamamlanır, süzülür veya durulması için beklenir: Bundan 50 ml.'lik butona 40 ml. alınır.Üzerine 3 damla Bromkresol yeşili belirtecinden damlatılır. Renk sarıya dönüşünceye kadar damla damla H_2SO_4 %10'dan katılır. Nitritlerin nitrata okside olmaları için 0,2 N $KMnO_4$ çözeltisinden çalkalamak şekliyle ve damla damla uçuk pembe renk 1 dakika sabit kalıncaya kadar ilave edilir. Tekrar 1 ml.

H₂SO₄ ve 1 ml. %20'lik Fosfotungustik asit ilave edilir. Balon 50 ml.'ye tamamlanıp çalkalandıktan sonra süzülür.

Bu süzüntüden 500 ml.'lik bir ertene en çok 20 ml. aktarılır. hesaba göre 20 ml. fazla kullanmak gerekiyorsa, süzüntü hafif alkali yapılır ve suyu uçurularak konsantrasyon yükselir.

Bütün klorürlerin ve fazla Fosfotungustik asidin çöktürülmesi için yeteri kadar Ag-NH₄OH çözeltisi katılır. Genelde 1-2 ml.yeterlidir. Süzmeden önce erlendeki miktarın 3 katı H₂SO₄ katılır. Erlenin ağzı kapatılır, çalkalanır 35°C kadar soğutulur. 1-2 damla m-ksilenol katılır. Tekrar ağzı kapatılır çalkalanır ve 30 dk. 30-40°C de saklanır.

Sarıdan kahverengimsi sari renk, nitratın varlığını gösterir. Nitratlama tamamlandıktan sonra üzerine 150 ml. su konur. Destilasyon cihazına alınarak içinde 5 ml. NaOH bulunan erlene 40-50 ml. destilat toplanır. Bu destilat 100 ml.'lik bulona alınarak su ile 100 ml.'ye tamamlanır. Spektrofotometre 1 cm. optik yollu kuvvetler kullanarak 450 nm okuma yapılır.

Standart Kurvenin Çizimi:

10 ml. Standart nitrat çözeltisi, 0.05 ml m-ksilenol ve 30 ml. H₂SO₄ su ile 500 ml'ye tamamlanır ve bundan bir seri standart çözeltiler hazırlanarak okunan absorbans değerine karşılık litrede mg. olarak nitrat değerleri işaretlenerek kurve çizilir.

Sonuç:

Spektrofotometre de okunan absorbans değerine karşılık standart kurveden nitrat miktarı hesaplanır. **(Kaynak 1)**

10. NİTRİT TAYİNİ

Prensip:

Et mamullerindeki nitritin, Griess I ve Griess II ayraçları ile oluşturduğu kırmızı rengin Spektrofotometre de 520 nm. dalga boyunda ölçülmesi ilkesine dayanır.

Araç ve Gereçler:

- Spektrofotometre
- Su banyosu
- Ölçü balonu 50, 100, 500 ve 1000 ml.
- Filtre kağıdı
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Kimyasal Çözeltiler:

- HgCl₂ çözeltisi

- Chloroform
- Griess I çözeltisi: 1,5 gr. Sülfanilik asit %15'lik 300 ml. Asetik asitte çözülür.
- Griess II çözeltisi: 0,5 gr alfa-naftilamin 60 ml. su ile ağzı kapalı kaynatılır. Sıcak çözelti 300 ml. %15'lik asetik asit üzerine süzülür.
- Tanık çözeltisi: 50 ml.'lik cam kapaklı ölçü balonu içine NO₂ bulunmayan 50 ml. destile su konulduktan sonra eşit oranda karıştırılmış Griess I ve Griess II çözeltisinden 2 ml. eklenir.
- Standart Nitrit Çözeltisi: 2,2 gr. AgNO₂ 400 ml. sıcak su ile karıştırılır. 2,06 gr. NaCl eklendikten sonra AgCl çökene kadar çalkalanır ve 1000 ml.'ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözeltinin 1 ml.'de 0,2 gr N vardır.
- Standart kurvenin çizimi: 50 ml. standart nitrit çözeltisi destile su ile 1000 ml.'ye tamamlanır. Bu çözelti alınarak 100 ml.'ye destile su ile tamamlanır. Böylece 1,2,3,4,5 mg/ml'lik çözeltiler elde edilmiş olur. Her birinden 50 ml. alınıp üzerine eşit oranda karıştırılmış Griess I ve Griess II çözeltisinden 2 ml. konur. Bir saat renk oluşumu için bekletilir. Sonra spektrofotometrede 1 cm. optik yollu kuvvetler kullanılarak tanık çözeltisi şahitliğinde 520 nm de optik dansite okunur. Her bir çözeltiliye karşı okunan optik dansiteler grafiğe işlenerek kurve çizilir ve K sabitesi hesaplanır.

$$K = \frac{\text{Konsantrasyon (mg/ml)}}{\text{Optik dansite}}$$

İşlem:

50 ml.'ik bir elene deney numunesinden 5 gr. tartılır üzerine 10 ml. 80°C deki nitritsiz destile su konur. Bir cam bugetle iyice karıştırılarak bütün et parçaları dağıtılır. Sonra 500 ml.ölçülü bulona aktarılır. Beher bir kaç defa nitritsiz su ile bulona yıkanır. Bulon içeriği yaklaşık 300 ml. oluncaya kadar sıcak nitritsiz su eklenir. Yarım saatte bir çalkalamak suretiyle sıcak su banyosunda iki saat tutulur. Bu sürenin sonunda 5 ml. HgCl₂ çözeltisi konur. Bulon oda ısısına gelince çizgisine kadar su ile tamamlanıp süzülür. 50 ml.'lik bir bulona bu süzükten 10 ml. konur ve çizgisine kadar destile su ile tamamlanır. Üzerine eşit oranda karıştırılmış Griess I ve Griess II çözeltisinden 2 ml. konur. Bir saat sonunda oluşan renk spektrofotometrede 1 cm. optik yollu kuvvetler kullanılarak tanık çözelti şahitliğinde 520 nm'de optik-dansite okunur.

Sonuç: Okunan optik dansite değerinden örnekteki nitrit miktarı standart kurve yardımı ile doğrudan hesaplanabilir veya aşağıdaki formülden bulunabilir. (Kaynak 1)

$$\text{Nitrit miktarı (mg / ml.)} = K \times \text{OD} \times S$$

11. ET VE MAMULLERİ - NİŞASTA TAYİNİ

Araç - Gereç :

- Analitik terazi, ± 0.001 g duyarlılıkta
- Santrifüj, 250 ml'lik tüpler kullanılabilir nitelikte, 1500 devir/dakika
- Santrifüj tüpleri, 250 ml'lik, ısıya dayanıklı
- Whatman süzgeç kağıdı; 12,5 cm çaplı No: 3 ve No: 1
- Vakum pompası
- Su banyosu
- Emzikli Erlen 250 ml'lik
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayırarç ve Çözeltiler:

- Çinko Asetat Çözeltisi; 12 g $\text{Zn (OAC)}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suda eritilir ve 100 ml'ye tamamlanır, taze hazırlanmalıdır.
- Potasyum ferrosiyaniid çözeltisi; 6 g $\text{K1Fe(CN)}_6, 3\text{H}_2\text{O}$ suda eritilir ve 100 ml'ye tamamlanır, taze hazırlanmalıdır.
- Bakır sülfat çözeltisi; 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ suda eritilir ve 1 lt'ye tamamlanır.
- Alkali tartarat çözeltisi; 200 g Rochelle tuzu ve 150 g NaOH sıcak suda eritilir, süzgeç kağıdından süzülür ve 1 lt'ye tamamlanır.
- Glikoz Standart Çözeltisi; 0.4 g püre glikoz suda eritilir ve 200 ml'ye tamamlanır.
- Nişasta indikatör çözeltisi; 1 g toz eriyebilir nişasta 20 ml soğuk suyla karıştırılır. Üzerine 500 ml kaynar su eklenir ve 10 dakika kaynatılır, soğutulur, birkaç damla kloroform ilave edilir.
- Fosfotungustik asit çözeltisi; 20 g fosfotungustik asit suda eritilir, 100 ml'ye tamamlanır ve süzgeç kağıdından süzülür.
- 1 ml çinko asetat ve 1 ml Potasyum ferrosiyaniid çözeltisi karıştırılır ve su ile 200 ml'ye tamamlanır. Taze hazırlanmalıdır.
- Petrol eter
- Hidroklorik asit, 1,5 N
- Hidroklorik asit, 1 + 2 oranında sulandırılmış
- Sülfürik asit, 1 + 3 oranında sulandırılmış

- Sodyum hidroksit, % 20'lik
- Potasyum iyodür, % 10'luk
- Potasyum siyanür (Rodanür)
- Sodyum tiyosülfat, 0.025 N

İşlem:

1- Ekstraksiyon ve Hidroliz:

Deney numunesinden 10 g 250 ml'lik santrifüj tüpüne tartılır. Numunenin içerdiği yağ, 25'er ml petrol eterle 2 defa ekstrakte edilir (Yağın numuneden ayrılması, işlem sırasındaki süzmelere engel olmaması içindir). Yağsız numune üzerine 100 ml su, 5 ml çinko asetat ve 5 ml potasyum ferrosiyamid çözeltileri eklenir. Tüplerin ağzı kapatılarak 15 dakika, zaman zaman kuvvetle çalkalayarak bekletilir, 15 dakika santrifüj edilir. Üstteki sıvı konik huni üzerine yerleştirilmiş Whatman No: 3 süzgeç kağıdından hafif emiş kullanılarak süzülür. Santrifüj tüpündeki kalıntıya 25 ml "1 ml çinko asetat + 1 ml potasyum ferrosiyamid çözeltisi / 200 ml" çözeltisi konulur, 10 dakika zaman zaman çalkalayarak bekletilir, 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki sıvı bir önce kullanılan süzgeç kağıdından, hafif emiş kullanılarak süzülür.

Son ekstraksiyon, tüpteki kalıntıya 25 ml "1 ml çinko asetat çözeltisi + 1 ml potasyum ferrosiyamid çözeltisi / 200 ml" çözeltisi eklenerek tekrarlanır. 10 dakika bekletilir, 10 dakika santrifüj edilir ve yine bir önceki süzgeç kağıdından hafif emiş kullanılarak süzülür.

Whatman No: 3 süzgeç kağıdının bulunduğu konik huni santrifüj tüpüne geçirilir. Süzgeç kağıdı 90 ml 1,5 N sıcak (yaklaşık 70°C) Hidroklorik asit ile yıkanır (Yapışmış yağları ve serbest nişastayı eritmek için). Yalnız 90 ml sıcak hidroklorik asitin önce 40 ml'si süzgeç kağıdına dökülür. Kağıt delinerek asitin santrifüj tüpüne akması sağlanır. Asitin kalan miktarı ile de süzgeç kağıdı yıkanır. Kağıt üzerindeki kalıntı neticenin yüksek çıkması için santrifüj şişesine aktarılmaz. Santrifüj tüpü kaynayan su banyosu içine, su seviyesi tüp içindeki madde seviyesine gelecek şekilde daldırılır. Su banyosundaki su seviyesinin ilk durumda tutulmasına dikkat edilerek tüp içeriği 1,5 saat sık sık karıştırılarak hidrolize edilir. Bu işlemde geri soğutucu kullanılmaz. Tüp 1,5 saat sonra derhal soğutulur, sodyum hidroksit çözeltisiyle alkali yapılır (yaklaşık 27 ml) ve 10 ml hidroksit asit (1 + 2) ilave edilir ve 200 ml'lik ölçü balonuna aktarılır. Santrifüj tüpü 15 ml fosfotungustik asit çözeltisiyle ve birkaç defa 10 ml destile su ile çalkalanarak, ölçülü balona eklenir ve balon hacmine destile su ile tamamlanır, ağzı kapatılır, çalkalanır, 30 dakika bekletilerek Whatman No: 1 süzgeç kağıdından süzülür.

2- İndirgen Şekerlerin Analizi:

Süzüntüden 20 ml, 200 ml'lik ölçülü balona alınır. 20 ml bakır sülfat çözeltisi ve 20 ml alkali tartarat çözeltisi ilave edilir. 2 dakikada çalkalanmak suretiyle kaynama noktasına getirilir ve 1 dakika kaynatılır, hemen soğutulur, destile su ile hacmine tamamlanır, karıştırılır.

Bu çözeltilerden 50 ml alınır. 25 ml Potasyum iyodür çözeltisi, 5 ml sülfürik asit (1 + 3) çözeltisi, 2 ml Nişasta indikatör çözeltisi, 2 g toz potasyum siyanür eklenerek tiyosülfat çözeltisiyle sarı renk kayboluncaya ve açık leylak rengi meydana gelinceye kadar titre edilir ve harcanan miktar kaydedilir.

Aynı işlemler 20 ml süzöntü yerine 20 ml destile su ve 20 ml standart glikoz çözeltisiyle tekrarlanır ve titrasyonda harcanan tiyosülfat miktarları kaydedilir.

Sonuç:

$$\text{Nişasta (\% g)} = \frac{4 \times 0,9 \times (B - S)}{B - D}$$

Burada;

0,9 = Glikozun nişastaya dönüşüm faktörü

S = Deney numunesinin titrasyonunda tiyosülfat miktarı (ml) harcanan 0.025 N sodyum tiyosülfat miktarı (ml)

B = Tanık denemenin titrasyonunda harcanan 0,025 N sodyum tiyosülfat miktarı (ml)

D = Standart glikoz çözeltisinin titrasyonunda harcanan 0,025 N sodyum tiyosülfat miktarı (ml) (**Kaynak 2**)

12. ET VE MAMULLERİ - RUTUBET TAYİNİ

Yöntemin İlkesi:

Deney numunesinin kum ve etan ile iyice karıştırılması, karışıma bir su banyosunda ön kurutma işlemi uygulanması ve numunenin $103 \pm 2^\circ\text{C}$ 'da değişmez ağırlığa gelinceye kadar kurutulması ilkesine dayanır.

Araç - Gereç :

- Et kıyma makinesi, laboratuvar tipi, çapı 5 mm'yi geçmeyen delikli bir aynası bulunan.
- Kurutma kabı, düz porselen veya metal örneğin nikel, alüminyum, (paslanmaz çelik) en az 60 mm çapında. 23 mm yüksekliğinde.

- Su banyosu, 60 - 80°C' ye ayarlanabilen
- Desikatör, içerisinde etkin bir kurutucu bulunan.
- Analitik terazi, 0,001 g duyarlıkta
- Genel laboratuvar araç ve gereçleri

Ayırar ve çözeltiler:

- Kum, delik açıklığı 1,4 mm olan bir elekten geçip, delik açıklığı 250 mikron olan elekte kalan incelikte. Kum musluk suyu ile yıkanır, seyreltik hidroklorik asit ile $d_{20} = 1,19$; 1 : 1 oranında sulandırılmış devamlı karıştırılarak 30 dakika kaynatılır. Bu işlem, asit kaynadıktan sonra sarıya dönmeyinceye kadar bir miktar asit daha katılarak tekrarlanır. Sonra kum, klorür deneyi negatif çıkıncaya kadar damıtık su ile yıkanır. Kum, 150 ila 160°C'da kurutulur ve hava girmeyen kapalı şişede saklanır.
- Etanol, en az % 95 (v/v)'lik

Numunenin Hazırlanması:

Numune kıyma makinesinden en az 2 kez geçirilerek kıyılır, karıştırılır. Hava almayan, tamamen (tam) doldurulmuş kaplarda, bozulmayacak ve bileşimini değiştirmeyecek şekilde saklanır. Numunenin mümkün olduğu kadar kısa zamanda (24 saati hiç bir surette geçmeyecek şekilde) analizi yapılmalıdır.

İşlem :

İçinde bir miktar kum, bunun 3 - 4 katı deney numunesi ve cam baget bulunan kurutma kabı etüvde 30 dakika $103 \pm 2^\circ\text{C}$ 'da kurutulur.

Sonra desikatöre alınarak oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 0,001 g duyarlıkla tartılır. Kıyma makinesinden en az iki kez geçirilerek hazırlanan numuneden 5 - 10 g kurutma kabına konur üzerine yaklaşık 5 - 10 ml etanol katılır ve cam bagetle karıştırılır.

Kurutma kabı içindeki karışımla birlikte sıçramayı önleyecek şekilde 60 - 80°C'a ayarlanan su banyosu üzerinde arasına karıştırılarak etanol uçuncaya kadar ısıtılır. Sonra etüvde 2 saat tutulur. Etüvden çıkarılan kapsül desikatör de soğutulur ve tartılır. Kurutma ve tartma işlemi sabit ağırlığa gelene kadar devam edilir.

Sonuç :

Rutubet miktarı (R), ağırlık yüzdesi olarak aşağıdaki formülle hesap edilir. (Kaynak 2)

$$R (\%) = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{(m_1 - m_0)}$$

Burada;

m_0 = Kapsül, baget ve kumun ağırlığı, g

m_1 = Numune ile birlikte kapsül, baget ve kumun kurutulmadan önceki ağırlığı, g

m_2 = Numune ile birlikte kapsül, baget ve kumun kurutulduktan sonraki ağırlığı, g dır.

13. YAĞ TAYİNİ

Et ürünlerinde yağ miktarının tayininde aşağıdaki metotlardan yararlanılır.

a. Gerber metodu

Kıyma makinesinden geçirilmiş veya iyice doğranıp ezilmiş et ürününden 3-5 g kadar bir kısım butirometre ye konulur. Üzerine yoğunluğu 1.820 olan H_2SO_4 'den 8 ml ilave edilir. Butirometre, 60-70°C'a ayarlanmış benmaride yağ kısımları iyice eriyinceye kadar tutulur. Yağ koyu kahverengi bir tabaka halinde toplanır. Sonra üzerine 1 ml amil alkol konulur. Tüp, 2000 devirde 5 dakika santrifüje edilir. Bu amaçla ısıtılabilen santrifüjlerin kullanılması tavsiye edilir. Gerber butirometresi tekrar su banyosuna konularak bir süre tutulur. Üst kısımda toplanan yağ skaladan okunarak belirlenir.

b. Ekstraksiyon metodu

Araç ve gereçler :

- Soxhelet ekstraksiyon cihazı
- Ölçü silindiri
- Kağıt kartuş
- Benmari

Kimyasal maddeler :

- Etil-eter (veya petroleter)

İşlem : Et ürününün muhtelif yerlerinden hazırlanan 2.5 g ağırlığındaki kısım kağıt kartuşa yerleştirilir. Bu amaçla hazır kartuşlar kullanılır veya süzgeç kağıdından bir kartuş hazırlanır. Kartuş, soxhelet ekstraksiyon cihazındaki özel yerine konulur. Önceden ısıtılıp desikatör de soğutulduktan sonra ağırlığı belirlenmiş olan ağzı tıraşlı özel balona etileter veya petrol-eter konulur: Etileter kullanılması halinde benmari ısısı 40°C olarak ayarlanmalıdır. Buharlaşan eter, et ürünündeki yağı tamamen ayırıcaya kadar işleme devam edilir. Sonra sistemden alınan balon 105°C'da 1 saat kadar tutularak eterin tamamen uçurulması sağlanır. Desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak belirlenen ağırlıktan balonun boş iken tespit edilen ağırlığı çıkarılır ve hesapla örnekteki yağın yüzdesi bulunur.

c. Weilbull-Stoldt metodu

Araç ve gereçler :

- Soxhelet ekstraksiyon cihazı
- Beher

- Pipet
- Cam huni
- 2 adet saat camı (yakl. 10-12 cm çapında)
- Süzgeç kağıdı

Solüsyonlar :

- HCl, 4 N
- Petroleter
- n-hekzan

İşlem :

Soxhlet ekstraksiyon cihazının ağız tıraşlı 250 ml'lik balonuna birkaç tane sünger taşı atılır. Balon, kurutma dolabında 101-105°C da 1 saat kurutulur. Sonra desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulur ve tartılarak ağırlığı belirlenir. Önceden homojen hale getirilmiş 3-5 g ağırlığındaki et ürünü parçası 400 ml'lik bir behere konulur. Üzerine 4 N HCl'den 150 ml ilave edilir. Sonra bir cam çubuk ve birkaç sünger tay da behere bırakılır. Yaklaşık 10 cm çapında bir saat camı ile örtülen beher kaynayıncaya kadar ısıtılır. Beher içeriğı bir saat süreyle hafifçe kaynatılır ve sık sık karıştırılır. İçeriğe 150 ml kaynar su ilave edilir. Öte yandan bir cam huniye yerleştirilen süzgeç kağıdı su ile iyice ıslatılır ve beherde kaynar durumda bulanana sıvı süratle süzülür. Beher ve saat camı sıcak su ile üç defa dikkatlice yıkanır. Süzgeç kağıdı hiç asit ihtiva etmeyecek şekilde sıcak su ile birkaç defa yıkanır. Sonra yaklaşık 12 cm çapındaki bir saat camına konularak sıcaklığı önceden 101-105°C'a ayarlanmış kurutma dolabına yerleştirilir. Kurutulmuş süzgeç kağıdı bir ekstraksiyon kartuşuna yerleştirilir. Saat camı üzerinde kalmış olabilecek iz halindeki yağ ise petroletere veya hekzana batırılmış bir pamukla emilir. Bu pamuk da aynı şekilde ekstraksiyon kartuşuna konulduktan sonra kartuş cihazdaki yerine bırakılır. Sonra ekstraksiyon çözeltisi (etileter veya petroleter) ekstraksiyon cihazının balonuna konulur. Bu arada beherin iç duvarı ve kapak olarak kullanılan saat camının iç yüzeyi çözeltinin bir kısmı ile iyice yıkanır. Bu çözelti de balona aktarılır. Bundan sonra balon kum veya su banyosuna 4 saat bırakılarak etileter veya petroleter uçurulur. Kalan çözelti maddeleri hava tazyiki ile uzaklaştırılır. Yerinden alınan balon kurutma dolabında 101-105°C da 1 saat süre ile yatık durumda bırakılarak kurutulur. Müteakiben desikatörde soğutulup tartılır. Tartımlar arasındaki fark %0.1'e ulaşıncaya kadar tartı işlemine devam edilir. Toplam yağ miktarı aşağıdaki formülden bulunur.

$$F = \frac{(B - A) \times 100}{C}$$

F: Kütlece % yağ oranı

A: Boş balonun sünger taşlarıyla birlikte ağırlığı (g)

B: Balonun kurutulduktan sonra yağ ile birlikte ağırlığı (g)

C: Deney örneğinin kütlesi (g)

Aynı örnekten iki defa tayin yapılmalı ve iki tayin sonucu arasındaki fark %0.5'i geçmemelidir. **(Kaynak 3)**

14. TUZ TAYİNİ

Kalitatif Tayin

Et ürününden hazırlanan ekstrakt'a birkaç damla taze hazırlanmış gümüş nitrat eriyiği ilave edilir ve bir süre beklenir. Beyaz parlak görünümlü AgCl oluşumu örnekte NaCl'in varlığını gösterir.

Kantitatif tuz tayin (Mohr metodu)

a. Prensi

Ortamdaki klorürlerin gümüş klorür halinde çökeltilmesi ve serbest kalan gümüş iyonlarının indikatör olarak ilave edilen nötr potasyum kromat ile tuğla kırmızısı bir renk vermesi (gümüş kromat oluşumu) esasına dayanır.

b. Araç ve gereçler

- Balon (500 ml'lik)
- Beher (100 ml'lik)
- Büret
- Homojenizatör

c. Eriyikler

- İndikatör solüsyonu (%10'luk nötr potasyumkromat)
- AgNO₃ solüsyonu (%10'luk)

d. İşlem

Örneğin muhtelif kısımlarından ayrılan 3-5 g'lık parça bir miktar destile su katılarak homojenize edilir. Yüksek devirli homojenizatörlerin (Ultra-Turrax) kullanılması önerilir. Elde edilen homojenizat 500 ml'lik bir balona aktarılır, hunide ve homojenizasyon, şişesinde kalan artıklar balon içerisine yıkanarak içerik 500 ml'ye tamamlanır. Tuzların erimesi için bir süre su banyosunda bekletilir. Sonra süzgeç kağıdından süzülür. Oda sıcaklığında bekletilen süzüntüden 50 ml'lik kısım bir behere alınarak üzerine 1 ml indikatör ilave edilir. Sonra 0.1 N AgNO₃ eriyiği ile tuğla kırmızısı renk oluşumuna kadar titrasyon yapılır. Sarfedilen gümüş nitrat solüsyonu (A) aşağıdaki formülde yerine konarak NaCl'in % oranı belirlenir. **(Kaynak 3)**

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{A \times 0.00585 \times 100 \times 5000}{\text{Alınan örnek (g)} \times 50}$$

15. KANIN İYİ AKITILIP AKITILMADIĞININ TESPİTİ

Kesilen hayvanların kanının iyi akıtılıp, akıtılmadığının tespiti önemlidir. Kanın pH'sı 7-7.5 olup proteinden de zengin olması nedeniyle etin çabuk bozulmasına yol açar. Şüpheli hallerde kanın iyi akıtılıp, akıtılmadığının tespiti gerekir. (Ölmüş veya agoni halinde kesilmiş hayvanlarda vücudun her tarafı kırmızı renkte, et kanlıdır, deri altı ve iç organlar venaları kanla doludur, deri yüzülmüş ise içerisi çok kanlıdır.) Bu durumu tespit için şu metotlar geliştirilmiştir.

1. Haemoglobin maserasyon deneyi :

REAKTİFLER :

Saf su

Eter.

MATERYAL :

Deney tüpü.

PRENSİP :

Sonuçta oluşan renge göre kanın iyi akıtılıp, akıtılmadığının tespiti.

TEKNİK : 5 g kadar et parçalanıp, bir tüpe konur. Üzerine 10 ml saf su ve birkaç damla da eter katılır, çalkalanır. Tüp dinlenmeye bırakılır. Su rengi incelenir, Kanı iyi akıtılmış et ise suda hiçbir renk görülmez. Kanı iyi akıtılmamışsa, bu açık veya koyu bir renk alır. Tüp bir müddet dinlendirilir. Sonra renk incelenir.

SONUÇ :

Kan iyi akıtılmışsa, suda renk yoktur.

Kan iyi akıtılmamışsa, su açık veya koyu kırmızımsı bir renk alır.

2. Kurutma kağıdı deneyi :

Bu maksat için Schleicher ve Schül firmasının 597 numaralı kağıdı kullanılır. Bu kağıtlar 1.5 cm eninde, 10 cm boyundadır. Muayenesi yapılacak etten bir parça, kağıt şerit üstüne konur ve 2 dk sonra et alınarak kontrol edilir. Kanı normal akıtılan ette, sadece etin değdiği yer ıslanır ve boyanır.

3. Kompresorium deneyi :

Kare şeklinde kurutma kağıdı kompresorium üzerine konur. Üzerine fasulye büyüklüğünde bir et parçası konarak, alet sıkıştırılır. Kanı iyi akıtılmayan ette ıslanan kurutma kağıdı kısımları kanla boyanır.

4. Haemoglobin Pseudo-Peroksidaz deneyi :

REAKTİFLER :

Guayak tentürü (96° alkolde %0,5'lik çözeltisi).

H₂H₂ (%3'lük)

MATERYAL :

Porselen kapsül, pens.

PRENSİP :

Okside olan maddelerin (örneğin; Guayakon asidi gibi), daha yüksek oksidasyon safhalarına ulaşması esasına dayanır. Kan boyama maddeleri ve bunların türevleri peroksidaz gibi etki yaparlar.

Okside olabilen organik madde + H₂O₂ \rightleftharpoons H₂O₂ + Okside olan organik madde.

TEKNİK :

Bir parça et porselen kapsüle konup, üzerine Guayak tentürü dökülür. Sonra %3 H₂O₂ solüsyonundan iki damla damlatılır. Burada kataliz tesiri ile birkaç saniye içinde oksijen kabarcıkları görülür. Normal kesim olmamışsa, 1 dk. sonra mavi dar bir şerit meydana gelir. 3 dk. sonra et parçası bir pensle tutulup, hafifçe çalkalanırsa, bu arada reaksiyon derecesine göre açık yeşil, boz veya hafif bir mavi renk alır. 5 dk. da reaksiyon okunmalıdır. Daha geç oluşacak rengin değeri yoktur. Kan iyi ve tam akıtılmadığında renk koyu menekşe-kahverengidir.

5. Raeder'in maserasyon deneyi :

REACTİFLER : (0.1 ml Löffler, Methylen blue, 40 ml su, seyreltik karbol fuksin solüsyonu) ayıraç boya solüsyonu.

MATERYAL :

Deney tüpü.

TEKNİK : Kıyılmış et, deney tüpüne konur (3 g). Üzerine 5 ml ayıraç boya solüsyonu ilave edilir, çalkalanır. 5 dk sonra her dakika başında kuvvetle çalkalanmak suretiyle dinlendirilir. oluşan renk kontrol edilir. Kanı iyi akıtılan ette renk değişmez, sıvı açık mavidir. Kanı az akıtılanlarda açık yeşil, çok kanlılarda koyu yeşil, iyi akıtılmayan ette kahverengi-yeşil renkler görülür. **(Kaynak 5)**

16. FOSFOR TAYİNİ

REAKTİFLER:

Saf su,

HCl (konsantre)

Fenol fitalein.

0.2 N NaOH.

0.5 N HCl.

MATERYAL :

Kıyma makinesi veya havan, pota, hassas terazi, kül fırını, volimetrik şişe, erlen, beher kadehi, cam huni, 2No-Whatman, su banyosu, turnusol kağıdı.

PRENSİP :

Sarfıyat sonucu fosfor tarafına bağlanan 0.2 N NaOH'a bağlı olarak fosfor miktarının tesbiti.

TEKNİK : 10 g kadar homojen numune alınıp, kıyma makinesi veya havanda iyice erilir, darası bilinen bir pota içine hassas olarak tartımı yapılır. Beyaz kül oluşuncaya kadar kül fırınına terk edilir, beyaz kül oluşmadıysa, fırından çıkartılır 5 ml HCl (konsantre) ilave edilir, kuruyuncaya kadar su banyosu üzerinde uçması için bekletilir. 25 ml HNO₃ (1/4 sol.) ilave edip, ikiye bölünür, yarısı alınır, NH₄OH ile nötralize edilir. Mayi bu işlemlerden sonra yumurta akı beyaz rengini alır. (İşlemler beyaz kül oluşumu için yapılır) Kül sulu HNO₃ ile hafif asite çevrilir. (Mayi tekrar berrak olacak.) 25 ml NH₄ molybdate- HNO₃ ilave edilir. 100 ml'lik bir volimetrik şişede H₂O ile 100 cc'ye tamamlanır. Bir erlenmayere bundan 50 ml alınır ve erlenin ağzına bir beher kadehi konarak birkaç saat ile 10 gün kadar bir müddet kendi haline terk edilir. Bir cam huniye 2No-Whatman süzgeç kağıdı konup, su ile ıslatılır, sonra bir erlenmayere oturtulur ve kendi haline terk edilmiş olan mayi dibindeki sarı tortu sarsılmadan yavaş yavaş bu filtre kağıdından sürülür (süzülecek mayi kristal halde çökmüş ise süzülmeden erimelerini sağlamak için 30 dk çalkalanır). Dipte kalan tortu gayet az su ile belirli aralıklarla yıkanarak aynı filtre kağıdından süzülür. Bu işlem tortular bitinceye kadar tekrar edilir. (İşlem gerekirse 20 kez bile tekrarlanabilir.) Süzme işlemi, dikkatli, hassas bir şekilde yapılmalıdır. Süzgeç kağıdı huniden alınır, katlanır ve eski erlenmayere yani ilk erlene konur ve üzerine 10 damla fenol fitalein indikatörü damlatılır. Alkali oluncaya kadar üzerine 0.2 N NaOH'dan ilave edilir (çalkalandığı zaman sabit kalacak erguvan rengin oluşması ile anlaşılır. Bu amaçla 0.2 N NaOH'dan 50-125 ml arası sarfıyat yapılır). Sarfedilen miktar 0.2 N NaOH erlenin üzerine kaydedilir. 10 damla fenol fitalein damlatılıp, 0.5 N HCl ile geri titrasyon yapılır (erguvan rengin kaybolarak, kirli-şeffaf bir hal alması gerekir).

Sarfedilen 0.5 N NaOH - sarfedilen 0.5 N HCl asite karşılık gelen 0.2N NaOH - numunedeki O₂ tarafından bağlanan 0.2N NaOH'un ml miktarıdır.

Faktör ; 1 ml 0.2N NaOH = 0.00027 g P

$$\%P = 100 \times \frac{\text{Sarfedilen 0.2N NaOH'ın ml miktarı}}{\text{Numune (g)}} \times \text{Faktör}$$

17. KALSİYUM TAYİNİ

REAKTİFLER :

HCl (konsantre).

HCl (1+4).

%3.5 (NH₄)₂C₂O₄ (amonyumokzalit).

Methyl Red. NH₄OH (1+1).

H₂SO₄ (1+4).

0.05 N K₂MnO₄

MATERYAL :

Havan veya kıyım makinesi, erlen (250 cc'lik), huni, beher, büret ve Whatman filtre kağıdı (2 numara), porselen kroze.

TEKNİK :

10 g homojen örnek kıyım makinesinden geçirilir ve darası alınmış bir porselen kroze ile hassas bir şekilde tartılır. Beyaz kül oluncaya kadar yakılır. Fırından çıkarıldıktan sonra 5 ml HCl {konsantre} ilave edilir ve su banyosunda kurutulur.

(1+ 4)lük HCl'den 20 ml alınır, su banyosunda ısıtılır, bir gün bekletilmiş Ca külü üzerine dökülür ve iyice karıştırılır. 250 ml'lik bir erlene filtre kağıdından süzülür. Sonra sıcak su ile porselen kroze iyice yıkanır ve aynı filtre kağıdından erlene süzülür. Bu işlem yaklaşık 30-40 ml su ile 3-4 kez tekrarlanır. Üzerine 10 ml %3.5'lük (NH₄)₂C₂O₄ ilave edilerek kaynatılır. Kaynama başlar başlamaz 2-5 damla Methyl red damlatılır. (ortam kırmızı olur.) Sonra içerik bulanık pembe oluncaya kadar NH₄OH (1+1) ile titre edilir ve birkaç dakika daha kaynatılır. Erlenin ağzına bir erlen kapatılarak içerik birkaç saatten birkaç güne kadar bekletilebilir. İçerik filtre kağıdından başka bir erlene süzülerek ilk erlenmayer birkaç kez yıkanarak tekrar süzülür. Tortuyu içeren filtre kağıdı alınarak ilk erlene konular ve üzerine 10 ml H₂SO₄ (1+4) ve 50 ml su ilave edilir. Yaklaşık 90°C'ye ısıtılır (kaynatılmaz). Sonra 0.05 N K₂MnO₄ ile sabit pembe renk oluşana kadar titre edilir.

$$\%Ca = \frac{\text{Harcanan } 0.05 \text{ N KMnO}_4 \text{ (ml)} \cdot 0.001 \text{ (faktör)} \cdot 100}{\text{Örnek miktarı (g)}}$$

BALIK

Balık Etinin Besin Değeri:

Günümüzde besin maddesinin hijyenik ve ekonomik olmasının yanında, protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral maddeleri dengeli biçimde ve oranda içermesi de arzu edilmektedir. Bu isteğe yanıt veren gıda maddelerinden bir grupta su ürünleri olup, bunlar içinde de ön sırayı balık almaktadır.

Genellikle su ürünleri miktar ve çeşitlilik bakımından, çocukların ve yetişkin insanların sağlıklarının devamı, organizmanın normal fonksiyon ve büyümesinde günlük gereksinimleri için önemli bir kaynaktır.

Balık hafif, kolay sindirilebilir, proteince zengin, yağ yönünde fakir, vitamin ve mineral madde yönünden yeterli ve doğal lezzette bir besin maddesidir.

Balık etinin kimyasal bileşimi özellikle, çevre sıcaklığı, balığın boyu, yaşı ve olgunluk durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

Balık etinin ana bileşeni de diğer gıdalar gibi su, yağ ve proteinden oluşmaktadır. Karbonhidrat miktarı çok düşüktür. Biyolojik yönden yüksek değerli protein, yağ ve yağda eriyen vitaminler yönünden önemli bir kaynaktır.

Balığın kas dokusu %75-80 oranında su içermektedir. Protein miktarı neredeyse sabit olup türler arasında çok büyük sapmalar göstermez. Balık eti %18-22 oranında ham protein içerir. Esansiyel aminoasitten % oranı kadın sütünde 100 olarak kabul edildiğinde, balıkta 93'tür.

Balığın yağ miktarında ise çok büyük sapmalar vardır. Balığın yağ miktarı türe, mevsime, fizyolojik koşullara, yeme, yetiştiği yere, yaş ve büyüklüğüne göre değişmektedir. Balıklar içerdikleri yağ miktarına göre yağlı ve yağsız olarak sınıflandırılırlar. Çoğunlukla %1'in altındakiler yağsız, %1-25 oranında yağ içerenler ise yağlı balık olarak sınıflandırılmaktadır.

Balıklarda A ve D vitaminleri yanında B kompleks vitaminleri de bulunmaktadır. Deniz balıklarının en fazla içerdiği mineral maddeler kalsiyum, magnezyum ve fosfordur. Yaşam için gerekli iz elementlerden demir, kobalt, iyot, bakır, mangan'da balıkta ideal miktarlarda bulunmaktadır.

Beslenme yönünden böylesine değerli bir besin maddesinin bileşimi kadar, tüketilebilme kalitesi de önemlidir.

Kalite, bir ürünün mükemmellik düzeyi olmayıp, kullanma, amacına uygunluk ve tüketici beğenisini karşılama düzeyidir.

Su ürünleri bağ doku yönünden fakir, boşluklu bir et yapısına sahip olduğu için kolay bozulabilen bir gıda maddesidir. Bu nedenle avlanmadan itibaren işleme ve depolama boyunca etkin bir kalite kontrolünün yapılması gerekmektedir.

Balıklarda bozulma sırasında oluşan kimyasal, mikrobiyolojik, fiziksel ve duyuşal olarak saptanabilen değişikliklerin belirlenmesiyle tazelik dereceleri hakkında fikir edinilebilir. Biyolojik materyaller heterojen bir yapıya sahiptir. Bu nedenle içermiş oldukları maddeler ile yıkım ürünleri; avlama yöntemi, avlanma bölgesi, beslenme, yaş, olgunluk siklusu, cinsiyet, hastalık, depolama, işleme ve nakliye koşullarından etkilenmektedir. Bunun sonucunda duyuşal, fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik yöntemlerle tam bir değerlendirme yapmak her zaman kolay olmamaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü duyuşal analiz bulguları diğer analiz bulgularına göre, karar vermede daha önemli bir parametre olmaktadır.

DUYUSAL ANALİZLER:

Gıda ürünlerinin yenme kalitesi için son kriter insan tepkisi olduğundan, herhangi bir gıda kalite değerlendirme programında, duyuşal testler önemli rol oynarlar. Gıdaların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini tayin etmek için enstrümantal yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar yapı, renk gibi özelliklerin ölçümünde kullanılmaktadır. Bununla birlikte duyuşal değerlendirme panelleri, enstrümantal yöntemleri garanti etmek için kullanılmalıdır. Enstrümantal yöntemler balığın yenme kalitesini tam olarak gösteremezler. Bunlar duyuşal değerlendirme panelleri ile tamamlanmalıdır. Duyuşal bir panel uygun bir şekilde yapıldığında objektif ve güvenilir bir kalite parametresi olabilir. İşlenmemiş su ürünlerinin tazeliklerinin belirlenmesinde Tablo-1 kullanılmaktadır. Bu tabloda her bir özellik için verilen toplam puanların aritmetik ortalaması alınır.

Duyuşal analizlerde ortalama 2.7 veya daha fazla puan alan balıklar çok taze (birinci) kalite 2 veya 2.7 arasında puan alan balıklar taze (ikinci kalite), 1 veya 1-2 arasında puan alan balıklar ticari (üçüncü kalite) balıklar olarak değerlendirilir.

Tablo-1- Balıklarda Tazelik Derecesini Belirlemede Kullanılan Duyusal Analiz Tablosu

DEĞERLENDİRİLEN ÖZELLİKLER				
	VERİLEN PUAN			
	3	2	1	0
GÖRÜNÜŞ				
DERİ	Kuvvetli parlak renklerde, berrak mukoz sıvı mevcut, renk değişikliği yok.	Kuvvetli fakat parlak olmayan renklerde, hafif bulanık mukoz sıvı mevcut	Mat renklerde, süt benzeri mukoz sıvı mevcut	Cansız, soluk renklerde, bulanık mukoz sıvı mevcut
GÖZLER	Kornea dış bükey, saydam, pupilla parlak renkte	Kornea dış bükey ve hafifçe çökük hafif yanar döner renkte,pupilla siyah bulanık görünüşte.	Kornea düz yanar döner renkte, pupilla bulanık görünüşte	Kornea ortası çökmüş süt benzeri görünüşte pupilla gri renkte
SOLUNGAÇLAR	Parlak kırmızı renkte, mukoz sıvı mevcut değil	Solgun pembe renkte, az miktarda mukoz sıvı mevcut	Donuk pembe renkte, berrak olmayan, mukoz sıvı mevcut	Kirli boz renkte, mukoz sıvı mevcut
BALIK ETİ	Mavimsi beyaz renkte, renk değişikliği mevcut	Balmumu sarısı renkte	Hafif bulanık	Bulanık
OMURGA BOYUNCA BALIK ETİ RENGİ	Renk değişikliği mevcut değil	Hafif pembe	Pembe	Kırmızı
ORGANLAR	Böbrekler, iç organlar ve aorttaki kan parlak kırmızı renkte	Böbrekler ve iç organlar mat kırmızı kan donuk renkte	Böbrekler, iç organlar ve kan soluk kırmızı renkte	Böbrekler, iç organlar ve kan kahverengimsi renkte
DİĞER VASIFLAR				
BALIK ETİ	Yüzeyi parlak sert ve elastiki	Sertliği ve elastikiyeti azalmış	Yüzeyi sarımsı renkte, cansız mat, hafifçe gevşemiş	Yüzeyi oldukça pürüzlü, gevşek ve pullar deriden kolayca ayrılabilir.
OMURGA	Balık etine sıkıca tutunmuş, ayrılacağı zaman kolayca kırılabilir.	Balık etine sıkıca tutunmuş	Balık etinden ayrılabilir	Balık etinden kolayca ayrılabilir
PERİTON Karın zarı	Sıkıca tutunmuş	Tutunmuş halde	Ayrılabilir halde	Kolaylıkla ayrılabilir
KOKU				
DERİ SOLUNGAÇLAR KARIN BOŞLUĞU	Deniz yosunu kokusu belirgin	Deniz yosunu kokusu azalmış	Deniz yosunu kokusu kaybolmuş asidik	Asidik

Kutulanmış balık konservelerinin duyusal analizlerinde ise Tablo-2 kullanılabilir. İlk önce görünüş, koku, lezzet ve kıvam yönünden değerlendirilir. Bunun sonucunda verilmiş puanlar her konserve tipi için belirlenen faktörlerle ayrı ayrı çarpılarak 5'e bölünür ve sonuçta her bir nitelik için elde edilen puanlar toplanarak kutulanmış balık konservesi örneğinin

sınıfı belirlenir. Bu değerlendirmede toplam 6 puandan az alan ürünler standart dışı olup insan gıdası olarak tüketilemez. 15 puan alan ürünler birinci sınıf, 14.9-13.0 puan alan ürünler ikinci sınıf, 12.9-11.0 puan alan ürünler üçüncü sınıf, 10.9-6 puan alan ürünler dördüncü sınıftır.

Dondurulmuş veya soğutulmuş ürünlerin duyu analizinde Tablo-3 kullanılmaktadır. Her bir özellik için verilen toplam puanların aritmetik ortalamasına göre kalite sınıflarına ayrılır. 2.7 ve daha yukarı puan alan ürünler iyi (ikinci kalite), 1-2 arası puan alan ürünler orta (üçüncü kalite), 0-1 arası puan alan ürünler bozulmuştur. **(Kaynak 1)**

Tablo-3- Pişirme Deneyinde Kullanılan Tablo

	3	2	0
RENK Yağ Rengi	Beyaz (ya da kendine özgü) Açık sarı	Gri Sarı	Grimsi-siyah Sarı-kahverengi
KOKU	Hoş kendine özgü	Kokusuz	Küflü, sokucu, balıgımsı amonyak
KAS YAPISI	Kas bağları sıkı, miyomer, yaprak şeklinde	Kas bağları sıkı, miyomer kısmen dağılmış, parçalanmış	Parçalanmış, dağılmış
YAPI “Çiğneme Deneyi”	Sulu elastik sıkı	Biraz yumuşamış, lapamsı	Kuru, sert, lapamsı
LEZZET	Kendine özgü, aromatik	Aromatik hafif lezzetsiz	Balıgımsı amonyak benzeri acı

FİZİKSEL MUAYENELER:

Çabuk uygulanmaları bakımından besin kontrolünde önemli yer alırlar.

a. Balık kaslarında pH değerinin ölçülmesi

Serbest hidrojen iyonlarının tayini için pratikte tek elektrotlu portatif elektro pH metreler kullanılır. Elektrotlar, balık etine sokulabilecek özelliktedir. Yuvarlak veya misket şeklindeki elektrotların kullanılması halinde, balık etinin önceden homojen hale getirilmesi lazımdır.

pH değerinin kolorimetrik yolla ölçümü için fenol kırmızısından yararlanılır. Bu amaçla muayene edilecek balıktan fasulye tanesi büyüklüğünde bir kas parçası alınarak porselen plakanın çukurunda birkaç ml 1: 10.000 oranındaki fenol kırmızısı eriyiği ile karıştırılır. Reaktifin kırmızı rengi, pH değerinin 7 olması halinde portakal rengine döner. Balıklarda kritik pH değerinin 7 olması bakımından fenol kırmızısı, nitrazin sarısına tercih edilmelidir. Çünkü daha çok et ve et ürünlerinde yararlanılan nitrazin sarısının renk değişimi pH 6.4’de gerçekleşir.

Bazı araştışıcılar etin tazelik durumunun tespitinde kesinlikle pH değerinin belirlenmesi üzerinde dururlar. Yeni tutulmuş balıkların pH değerleri 6-6.5 arasındadır. Ludorf (1960)'a göre balıklar, etlerindeki pH değeri 6.8'e yükselinceye kadar tketelebilirler. Bayatlamış ve bozulmuş balık etlerinin pH değerleri kaide olarak 7'nin üzerindedir. Ancak, bazı balıkların etleri yeni tutuldukları sırada bile alkalik reaksiyon gösterirler. Bu nedenle balıklarda yalnız pH değerine dayalı hüküm verilmesi doğru değildir.

b. Balıklarda elektrik iletişim kabiliyetinin llmesi

Balık dokularındaki parçalanmanın giderek artmasıyla yüksek ve alçak frekanslı alternatif akımlar arasındaki direnç farkı giderek azalır. Bunun tespiti amacıyla "Fisch-Tester V" adı altında bir cihaz geliştirilmiştir (Hennings; 1963). Cihazda bir ölüm kısmıyla balıklara tespit edilen elektrot kısmı vardır. Balıkların tazelik durumları, aletin skalasında okunan değerlere göre belirlenir. Ancak, aşağıda gösterilen durumların varlığında yanıltıcı ölüm değerleri ortaya çıkabilir.

- Ölümün yapıldığı noktada balık derisinde zedelenmeler varsa,
- Ölümden önce balıkların pulları çıkarılmışsa,
- Balık, çeşitli elektrolitlerle (tuz vs.) muamele edilmişse,
- Balığa tam veya kısmi dondurma uygulanmışsa,
- Balıklar kuvvetli mekanik etkilere uğramışsa,
- Ölümün yapıldığı anda balığın ısı derecesi 10°C'ı aşmışsa,
- Balığın derisinde kuruma veya kıvrımlar meydana gelmişse,
- Grafit elektrotun temas yüzeyi zamanla aşınmışsa.

Büyük miktarlar halindeki balıkların tazelik derecelerinin kontrolünde bu yöntemden yaygın olarak yararlanılır.

c. Balıklarda göz sıvısında kırılma indisinin llmesi

Bayatlamaya başlayan balıklarda kurumaya bağlı olarak göz bebeğinden kopan parçaların göz sıvısına karışması, orbital sıvının konsantrasyonunun artmasına neden olur. Bu da optik kırılmayı arttırır.

nce 2-10 ml kapasiteli bir enjektör yardımıyla bulbusa girilerek kornea ve skleranın birbirleriyle sınır teşkil ettikleri bölgeden ve yaklaşık 1-2 cm derinden birkaç ml göz sıvısı çekilir. Gz sıvısı, ya doğrudan doğruya refraktometrenin muayene prismaına konulur veya steril bir tüpe alınarak bilahare muayene edilmek üzere buzdolabında saklanır. Alınan örneklerin saklama süresi 24 saati aşmamalıdır. Gz sıvısı özelliğini, 20°C'da ancak birkaç saat koruyabilir. Genellikle muayenenin 2 saat zarfında yapılmasıyla güvenilir bir ölüm sağlanır. Abbe refraktometresiyle yapılan ölümlerde sağlıklı sonuçlar alınır. Laboratuvar

dışında, mesela balıkhanelerde veya balıkçı gemilerinde yapılacak ölçümlerde el refraktometresinden de yararlanılabilir.

Balıkların göz sıvısının muayenesinde ölçü alanı 1.3300 den 1.3500'e kadar olan refraktometrelerin kullanılması uygundur. Abbe refraktometresinin ölçüm alanı 1.300 ile 1.7100, el refraktometresinin ölçüm alanı 1.330 ile 1.380 RI arasındadır. Abbe refraktometresine bir termostat bağlanabilir. Ancak anormal ısı değişimlerinde termostat zorunlu olarak kullanılır. Ölçüm çoğunlukla oda ısısında (20°C) yapıldığından, ısının ayarlanmasına gerek yoktur. Ölçüm yapılırken balıkların her iki gözünden alınan sıvının kullanılması tavsiye edilir. Göz sıvısının, balıkların tazelik durumlarının belirlenmesi amacıyla refraktometrik ölçümü, özellikle morina ve som balıklarında iyi sonuçlar verir. Bu balıklara ait refraktometrik değerler Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo-4- Bazı Balıklarda Kırılma İndisine Göre Tazeliğin Tespiti

Balıklar	Tazelik Derecesi	Kırılma İndisi
Som Balığı	Çok İyi	en fazla 1.3355
	İyi	1.3356 – 1.3365
	Orta	1.3366 – 1.3390
	Bozulmuş	1.3391'den fazla
Morina Balığı	Çok iyi	en fazla 1.3360
	Orta	1.3361 – 1.3390
	Bozulmuş	1.3390'dan fazla

Göz sıvısının refraktometrik ölçümünde dikkat edilecek noktalar :

- Sıvısı akmış veya zedelenmiş balık gözleri muayene için kullanılmaz,
- Göz sklerasına ait parçaların sıvı içinde bulunması ölçümü etkilemez. Çünkü, bunlar göz sıvısından kolayca uzaklaştırılırlar,
- Sağ ve sol gözün sıvısı arasındaki fark 0.0018 RI değerinden fazla ise, bu göz sıvıları ölçüm için kullanılamaz,
- Transparansını kaybetmiş, bulanık bir manzara veren göz sıvıları refraktometrik ölçümde kullanılmamalıdır. Bu durumdaki göz sıvıları santrifüjden geçirilmeli ve filtre edilerek berraklaştırılmalıdır,
- Balıklar tuzlanmışsa veya göz sıvılarına kan sızmışsa, ölçümlerde organoleptik muayene bulgularına ters düşecek ölçülerde yüksek RI değerleri elde edilir. Böyle durumlarda göz sıvısı üzerinde yapılan refraktometrik ölçüm sonuçları değerlendirilmez. **(Kaynak 3)**

KİMYASAL MUAYENELER

1. Uçucu Bazik Azot (Total Volatil Baz -TVB-) Tayini

Balıkta bozulmanın giderek ilerlemesiyle uçucu bazik azotlu maddelerin miktarı da artar. Bozulma sırasında uçucu bazlar, aminler ve organik asitler, aminoasitlerin ve organik bazların deaminasyonu ya da dekarboksilasyonu ile oluşurlar. Hidrojen sülfid, merkaptan ve disülfidler bu bozulma kokusuna eklenirler. Bozulma kokusu, balıksı, bayat, küf kokulu, ransid, ekşimsi, amonyaklı, mayamsı, tatlı, asit ve putrit olarak belirtilir.

TVB-N tayini bozulmanın ilk devrelerinde hassas değildir. TVB-N çoğu tatlı su balıklarında soğutulmuş depolama esnasında, onların düşük veya önemsenmeyecek kadar az trimetilamin oksit içermeleri nedeniyle yavaş yavaş artar. Bu nedenle tatlı su balıkları için kullanımı sınırlıdır.

Prensip:

Örnek homojenize edilerek magnezyum oksit ilave edilir. Su buharı destilasyonu ile uçucu bazlar ayrılır, ayrılan bu bazlar 0.1 N asit ile titre edilerek TVB-N miktarı belirlenir.

Araç ve Gereçler:

- Hassas terazi
- Su buharı destilasyon cihazı
- Bunzen beki veya elektrikli cep ısıtıcı
- Huni (üst çapı 10 cm, alt çapı 2 cm)
- Büret 10 veya 25 ml'lik
- Erlenmayer 500ml

Kimyasal çözeltiler:

- Magnezyum oksit DAB 6
- Silikon köpük kesici
- Borik asit %3'lük
- Hidroklorik veya sülfürik asit 0.1 N
- Taşıro indikatörü (metilen kırmızısı ve metilen mavisi)

İşlem: En az 50 gr balık eti parçalanarak mikserde iyice homojenize edilir. Dondurulmuş örneklerde su kaybını engellemek için örnek bir kapta çözündürülür ve aynı kapta homojenize edilir.

1. Su buharı destilasyon cihazının 2 litrelik balonuna (3) 1-1.5 litre destile su, birkaç kaynama taşı konur ve musluğu (2) açık şekilde ısıtılır.

2. 500 ml erlenmayer içine 10 ml %3 borik asit, 8 damla taşıro indikatörü ve 100ml destile su konur. Sonra erlenmayer içine su buharı destilasyon cihazına bağlı soğutucu (7) borusu daldırılır.
3. Mikserde homojenize edilen örnekten 10 gr huni yardımıyla su buharı destilasyon cihazının içine yerleştirilen parçaya konur. Örnek bu parçaya bulaştırılmadan konulmalı gerekirse destile su ile parça yıkanmalıdır.
4. Örneğin üzerine 2-3 damla silikon köpük kesici damlatılır.
5. Bunun üzerine 1 çay kaşığı magnezyum oksit ilave edilir.
6. Sonra bu parça önceden ısıtılan balona (3) konulur.
7. Su buharı destilasyon balonu, bir köprü (5) ile hemen soğutucuya (6) bağlanır.
8. Balon içindeki su, musluk açık olacak şekilde kaynayıncaya kadar ısıtılır. 4 nolu parça içindeki örnek kondens suyu ile sulanmasını önlemek için musluk açık bırakılır.
9. Kaynama başlayınca açık olan musluk kapatılır. Soğutucunun ucu erlendeki sıvıya daldırılmış olarak 10 dakika daha sonrada daldırılmamış olarak 2 dakika kaynatılır.
10. Destilasyon tamamlandıktan sonra soğutucu erlen içinde yıkanır.
11. Bunzen beki söndürülür veya elektrikli ısıtıcı kapatılır.
12. Sıcakken 4 nolu parça balon içinden çıkarılır.