

**TURUNÇGİL ÜRÜNLERİNDE NARİNGİN
(4',5,7-TRİHYDROXYFLAVANONE 7-RHAMNOGLUCOSİDE)
MİKTARININ BELİRLENMESİ ve GİDERİLMESİ**

SERPİL YALIM

720908

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Gıda Mühendisliği
Ana Bilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR**

**MERSİN
ARALIK – 2002**

720908

**TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.


Tez Danışmanı

Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR

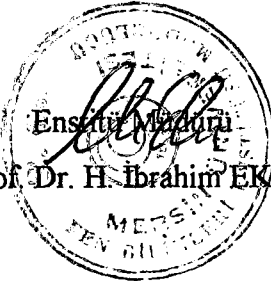

Jüri Üyesi

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ


Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ayla ÖZER

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 31/04/2003 tarih ve 2003/0039 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada; Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen turuncgil meyvelerinin (portakal, altıntop, mandarin, limon ve turunç türlerine ait mevcut çeşitler) taze ve konsantre meyve suyu ve kabuğunda, naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) düzeyleri ve yüksek orandaki naringinin naringinaz enzimi kullanılarak giderilmesi için optimum koşullar belirlenmiştir.

İncelenen portakal çeşitlerinin meyve kabuk ve sularında naringin düzeyinin sırasıyla 0,50-15,70 mg/L ve 0,12-2,63 mg/L aralığında olduğu, çeşit ve bölgeler arasında naringin düzeyindeki farkın t-testine göre %95 oranında önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Bu portakalların meyve suyu ve kabuk konsantrelerinde de naringinin saptanmış ve kabuk konsantresindeki naringin düzeylerinin (95-573 mg/L) içilebilirlik sınırının üstünde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca turunç kabuğunda 1399,62-1568,5 mg/L ve suyunda 124,52-325,3 mg/L; greyfurt kabuğunda 3192,70-7024,79 mg/L ve suyunda 308,30-510,07 mg/L aralıklarında naringin olduğu saptanmıştır.

Teknolojik olarak üretilen portakal kabuğu konsantresindeki yüksek düzeydeki naringin miktarının giderilmesi veya en az düzeye getirilmesi için; naringinaz enzimi ile optimum koşullarda (pH 4,0, 60°C sıcaklık ve 300 mg/L naringinaz), naringin gideriminin yaklaşık olarak % 30-40 oranında gerçekleştiği saptanmıştır. Uygulanan bu enzimatik yöntemle Akdeniz Bölgesi'nde yetişen çeşitli portakallardan elde edilen kabuk konsantrelerinde bulunan ve içilebilirliğini doğrudan etkileyen naringinin, içilebilir düzeye getirilebileceği ve diğer acılık giderme yöntemlerine göre uygulanabilirliği yüksek, ucuz ve ürünlerin doğal özelliklerini değiştirmemesi gibi büyük avantajlar sağlanabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Naringin, naringinaz, acılık giderme, turuncgil meyveleri.

ABSTRACT

In this research, naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) levels of fresh and concentrate fruit shells and juices of citrus fruits (sweet oranges, grapefruits, lemons, sour oranges etc.) grown in Mediterranean Region of Turkey, were researched. And also optimum conditions for naringinase to hydrolysing of naringin from citrus fruit samples were determined.

The analysis of sweet oranges species showed that fruit shells and juices had 0,50-15,70 mg/L and 0,12-2,63 mg/l naringin ranges, respectively. Due to the t-test, there were no significant differences between mean naringin values of species and locations at 95% confidence level. These orange species cloudy and juice concentrates also had naringin and naringin levels of cloudies (95-950 mg/L) were higher than threshold level.

On the other hand, sour oranges had 1399,62-1568,5 mg/L in their shells and 142,52-325,3 mg/L in juices; grapefruit shells had 3192,7024,79 mg/L and grapefruit juices had 308,30-510,07 mg/L naringin ranges.

In this research, naringinase used at optimum conditions (pH 4,0, 60 °C temperature and 300 mg/L naringinase) was used for debittering of orange cloudies which had high level of naringin and their naringin levels decreased about 30-40%. Cloudies made from oranges grown in Mediterranean area, can be debittered by this enzyme method. This method is more suitable, applicable and economic than the other debittering methods.

Keywords: Naringin, naringinase, debittering, citrus fruits.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, her aŐamada büyük emekleri geçen ve bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans çalışmamın yapılması sırasında beni yönlendiren ve bana yardımını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda HPLC aleti ve diğer tüm laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Etap Tarım A.Ő. Fabrika Müdürü Dr. Hikmet GüreŐ ve yardımlarını esirgemeyen başta Hatun Bahçe olmak üzere tüm Etap Tarım A.Ő. çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman için yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2. 1. TURUNÇGİL MEYVESİ (Citrus fruits)	3
2. 1. 1. Dünyada ve Türkiye’ de Turunçgil Üretimi	3
2. 1. 2. Turunçgil Meyvelerinin Yapısı	4
2. 1. 3. Turunçgil Meyvelerinin İşlenmesi ve Sorunları	6
2.2. TURUNÇGİL ÖRNEKLERİNDE FLAVONOİDLER ve NARİNGİN	9
2.3. TURUNÇGİL ÜRÜNLERİNDE FLAVANON GLİKOZİTLERİN NİTEL ve NİCEL TAYİNİNDE KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLER	14
2.4. TURUNÇGİL ÜRÜNLERİNDE NARİNGİN MİKTARININ AZALTILMASI	15
2.4.1. Naringinin Enzim Kullanılarak Giderilmesi	17
2.4.2. Enzim Kinetiği	20
3. MATERYAL ve METOT	25
3. 1. MATERYAL	25
3. 1. 1. Hammadde ve Alet-Ekipman	25

3. 2. METOT	28
3. 2. 1. Turunçgil Meyvelerinden Meyve Suyu ve Kabuk Suyunun Elde Edilmesi	28
3. 2. 2. Meyve ve Kabuk Suyunda Naringin Tayini	29
3. 2. 3. Naringinaz Enzimi ile Naringin Miktarının Azaltılması	30
3.2.3.1. Naringinase aktivitesinin tayini	30
3.2.3.2. Naringinase enzimi ile portakal ve greyfurt meyve sularında Naringin Miktarının Azaltılması	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. AKDENİZ BÖLGESİ' NDE YETİŞEN TURUNÇGİL MEYVELERİNİN BAZI TÜR VE ÇEŞİTLERİNİN NARİNGİN DÜZEYİ	31
4. 2. NARİNGİNİN NARİNGİNAZ ENZİMİ İLE GİDERİLMESİNDE OPTİMUM KOŞULARIN BELİRLENMESİ	36
4.2.1. Naringinaz ve Naringin Derişimine Bağlı Olarak Başlangıç Tepkime Hızlarının Belirlenmesi	36
4.2.2. Naringinazın Başlangıç Tepkime Hızlarına pH ve Sıcaklığın Etkisi	40
4.2.3. Naringinaz' ın K_m Değerinin Hesaplanması	43
4.3. PORTAKAL VE GREYFURT MEYVE SULARINDA NARİNGİN MİKTARININ AZALTIMASI	46
5. SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR	53
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	60

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Ülkemizde Üretilen Portakal Çeşitlerinin Nitelikleri	7
Çizelge 3.1. Turunçgil Meyvelerinin Tür, Çeşit ve Örnek Alınan Bölgeleri	25
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan HPLC Sisteminin Özellikleri	26
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Diğer Alet-Ekipmanlar ve Özellikleri	27
Çizelge 4.1. Akdeniz Bölgesi'nde Yetişen Turunçgil Meyvelerinin Bazı Tür ve Çeşitlerinin Naringin Düzeyi (mg/L)	32
Çizelge 4.2. Ticari Olarak Bazı Greyfurt Meyve Suyundan Üretilen Konsantrelerin Naringin Düzeyleri (mg/L)	34
Çizelge 4.3. Ticari Olarak Üretilen Portakal Meyve Suyu ve Kabuk Konsantrelerinin Farklı Partilerindeki Naringin Düzeyleri	35
Çizelge 4.4. Farklı Derişimlerde Naringinaz ve Naringin İçeren Çözeltilerde Naringin Miktarının Süreye Göre Değişimi (mg/L)	38
Çizelge 4.5. Sabit Derişimde Naringin(200 mg/L) ve Naringinaz(300 mg/L) İçeren Reaksiyon Çözeltilerinin Farklı Sıcaklık ve pH larda Naringin Miktarının Süreyle Değişimi	41
Çizelge 4.6. Farklı Naringinaz Derişimlerinde Lineweaver-Burk Grafiğinden Hesaplanan V_m , K_m ve R^2 Değerleri	44
Çizelge 4.7. Optimum Koşullarda Elde Edilen K_m Değerlerinin, Literatürdeki Optimum Koşullar ve K_m Değerleri ile Karşılaştırılması	45
Çizelge 4.8. Bazı Portakal ve Greyfurt Konsantrelerinin içerdiği Naringinin Optimum Koşullarda Naringinaz ile Giderimi	46
Çizelge 4.9. Doğal Portakal ve Greyfurt Suyundan Farklı Oranlarda Hazırlanan Karışımın İçerdiği Naringinin, Optimum Koşullarda Naringinaz ile Giderimi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Naringinin Kimyasal Yapısı	11
Şekil 2.2. Turunçgil Sularında Acılık Giderme İşlemi	16
Şekil 2.3. Lineweaver-Burk Hız Eğrisi	24
Şekil 3.1. Standart Naringin Kromatogramı	30
Şekil 4.1. Portakal Cloudynin Kromatogramı	31
Şekil 4.2. Greyfurt Konsantresinin Kromatogramı	31
Şekil 4.3. 50 mg/L Naringin ve 100 mg/L Naringinaz Çözeltisinde Naringin Miktarının Süreye Göre Değişimi	37
Şekil 4.4. Naringin Derişimine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları	39
Şekil 4.5. Naringinaz Derişimine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları	40
Şekil 4.6. Naringin Derişiminin Süreyle Değişimi	42
Şekil 4.7. Farklı pH Değerlerine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları	42
Şekil 4.8. Farklı Sıcaklık Değerlerine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları	43
Şekil 4.9. Lineweaver - Burk Hız Grafiği	44
Şekil 4.10. Naringinin Naringinaz Enzimi ile 60°C'de Hidrolizi (greyfurt suyu konsantresi, 11,8 briks ve 2,88 pH; Portakal -greyfurt (3:1) karışımı, 12,27 °Briks ve 3,71 pH; o: Portakal cloudy, 11,8 °Briks v 4,03 pH; p: % Portakal -greyfurt (1:3) karışımı, 10,12 °Briks ve 3,42 pH; Δ: sulu tepkime çözeltisi, 3,5 pH ;▲: sulu tepkime çözeltisi, 4,0 pH)	49

1. GİRİŞ

Akdeniz Bölgesi, ülkemizde turunçgil üretiminin yapıldığı en büyük alanların başında gelmektedir. Türkiye’de yılda ortalama 2 500 000 ton turunçgil üretilmekte ve bunların başında da portakal, mandarin, altıntop (greyfurt), limon ve turunç meyveleri gelmektedir. Bu meyveler büyük oranda doğrudan (sofralık) tüketilmelerinin yanında, önemli bir kısmı da meyve suyu gibi teknolojik ürünlere işlenmektedir. Akdeniz Bölgesi’nde yetişen turunçgil meyvelerinden elde edilen meyve suları ülkemiz iç pazarının önemli bir kısmını karşılamasının yanında, başta bir çok Avrupa ülkesi olmak üzere diğer ülkelere de meyve suyu ya da konsantresi olarak ihraç edilmektedir. Diğer taraftan son yıllarda bu ürünlerin kabukları da meyve suyuna işlenmekte ve ihraç edilmektedir.

Turunçgil meyveleri taze olarak tüm dünyada yaygın biçimde tüketilmesinin yanı sıra meyve suyu, dilim kompostosu, reçel, marmelat v.b. ürünler şeklinde de tüketime sunulmaktadır. Dünya genelinde işlenmiş portakal ürünlerinin %90’dan fazlasını meyve suyu ürünleri oluşturmaktadır.

Meyve sularına işlenecek turunçgil meyvelerinin belirli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması gerekmektedir. Çünkü meyvelerin meyve suyuna işlenmesinde bu özelliklerin önemli rolleri vardır. Bu meyvelerden elde edilen ürünlerin başlıca sorunlarından birisi acılık etmeni olan bileşenlerdir. Bu bileşenler meyveden kaynaklanabileceği gibi, meyvenin işlenmesi sırasında da meydana gelebilmektedir. Meyve sularında acılık veren bileşenlerin bulunması, duyuusal yönden içilebilirliğini etkilemektedir. Acılık etmeni olan bileşenlerin başında da naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) gelmektedir. Turunçgil ürünlerinde naringin de çoğu bileşenler gibi doğrudan meyvenin kendisinden gelmekte, meyve kabuğu ve suyundan elde edilen ürünlere de geçmektedir.

Turunçgil meyvelerinden elde edilen ürünlerin naringin düzeyleri, meyvelerin türüne ve yetiştikleri üretim alanlarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Meyve sularında naringin miktarı o meyve suyunun içilebilirliğini doğrudan

etkilediğinden, kullanılan meyvelerin kabuk ve meyve sularının başlangıç naringin düzeyi önemlidir. Diğer taraftan bu ürünlerin naringin düzeyleri, naringinin giderilmesi için kullanılacak olan fiziksel, enzimatik vb. yöntemlerin seçimi ve teknolojik olarak uygulanabilirliğini de etkilemektedir. Turunçgil meyvelerinin naringin düzeyi mevsimsel olarak değişebildiğinden, uygun hasat döneminin belirlenmesi de büyük önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada; Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ve meyve suyuna işlenen turunçgil meyvelerinin (portakal, altıntop, mandarin, limon ve turunç türlerine ait mevcut çeşitler) taze meyve suyu ve kabuğu ile bu meyvelerden elde edilen konsantrelerin naringin düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca; bu ürünlerdeki naringin miktarının, serbest naringinaz enzimi kullanılarak içilebilir düzeylere getirilebilmesi için optimum koşullar belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. TURUNÇGİL MEYVESİ (Citrus fruits)

Botanik olarak turunçgiller başlıca; *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* ve *Clymeria* olmak üzere 6 ana türden ve 7 tane de alt türden oluşmaktadır. Başlıca turunçgil ürünleri portakal (*Citrus sinensis*), greyfurt yani altıntop (*C. paradise*), turunç (*C. aurantium*), mandarin(*C. reticulata*) ve limon (*C. lemon*)'dur [1,2,3,4]. Çağdaş turunçgil taksonomisinde yalnızca 3 gerçek türün varlığı önerilmektedir bunlar;

- Mandarin (*C. reticulata*)
- Citron (*C. medica*)
- Pummelo (*C. grandis*)'dur [4].

Turunçgil meyveleri kabuk rengine göre de sınıflandırılmakta ve aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir [3].

a- Sarı renkli türler

<i>Citrus medica L</i>	: Zetrat-Limon
<i>Citrus lemon (L) Burm</i>	: Limon
<i>Citrus aurantifolia Swing</i>	: Lumie,Limette
<i>Citrus parandis(L) Osbeck</i>	: Pampelmuse
<i>Citrus paradisi Macfadyen</i>	: Greyfurt

b- Oranj renkli türler

<i>Citrus aurantium L.</i>	: Acı portakal
<i>Citrus sinensis(L) Osbeck</i>	: Tatlı portakal
<i>Citrus reticulata Blanco</i>	: Mandarin

2.1.1. Dünyada ve Türkiye' de Turunçgil Üretimi

Üzümünden sonra dünyada en fazla yetiştirilen meyve turunçgillerdir. Dünyada yıllık turunçgil üretimi onu takip eden elma üretiminin 2,5 katıdır [5]. Anavatanı

Güney Çin'dir [5,6]. Bugün yeryüzünde ekvatorun her iki tarafındaki subtropik kuşakta, yani 20. ve 40. enlemlerde turunçgiller yetiştirilmektedir [1,5].

Dünyadaki turunçgil üretimi özellikle son yıllarda artış göstermektedir. 1994-1999 yılları arasında %30 artış gösterdiği ve bunun içinde portakalın 43 milyon ton ile en fazla üretilen tür olduğu bildirilmektedir. Bunu 11 milyon ton üzeriyle mandarin ve mandarin melezi; 4 milyon ton greyluft ve yaklaşık 3 milyon ton ile limon izlemektedir [7]. ABD, 10,1 milyon ton ile en çok portakal yetiştiren ülkedir [1,5,7]. Dünya portakal üretiminin %60'ını sağlayan Brezilya ve ABD bu meyvelerin %85'ini işlemektedir [6,7]. Dünya genelinde işlenmiş portakal ürünlerinin %90'dan fazlasını meyve suyu ürünleri oluşturmaktadır [8]. ABD'de de Florida en çok greyluft ve limon üreticisiyken Çin, mandarini en çok üreten ülkedir. Ayrıca Akdeniz ülkeleri de turunçgil meyvelerinin önemli bir yetiştiricisi ve işleyicisidir [6,7].

1999 yılında dünya turunçgil üretimi 100 milyon tona Türkiye'deki üretim ise 2 milyon tona ulaşmıştır. 2000 yılı döneminde , Doğu Akdeniz Bölgesi ülkemiz, turunçgil üretiminde %70'lik oranla lider olmuştur [2]. 1995-1996 sezonunda dünyada üretilen 42932000 ton portakalın 880000 tonunu; 11757000 ton mandarinin 410000 tonunu; 3816000 ton limonun 440000 tonunu Türkiye üretmektedir [6].

Türkiye için turunçgiller ve portakal üretiminin bölgelere göre dağılımının incelendiği bir çalışmada üretim oranları toplam turunçgil ve portakal için sırasıyla Ege Bölgesi %16-12, Batı Akdeniz %32-20 ve en yüksek değere sahip Doğu Akdeniz (Çukurova) için ise %62-68 olarak bildirilmektedir. Ayrıca ülkemizde mevcut turunçgil suyu işleme hattı kurulu kapasitesinin %70 kadarının Çukurova Bölgesi'nde bulunduğu belirtilmektedir [8].

2.1.2 Turunçgil Meyvelerinin Yapısı

Botanik açıdan turunçgil meyveleri birbirleriyle aynı yapıyı gösterirler. Fakat diğer meyvelerden oldukça farklı yapıdadırlar. Bu nedenle turunçgil meyvelerinden

meyve suyu üretim teknolojisi diğer meyvelere uygulanandan çok farklıdır. Turunçgil meyvesi diğer meyveler gibi kabuk ve meyve etinden oluşmakta ve her iki bölüm de kendine özgü nitelik taşımaktadır [3].

Kabuk: Turunçgil kabukları flavedo ve albedo denen iki katmandan oluşmaktadır. Flavedo, en dışta bulunan rengi sarıdan portakal kırmızıya kadar değişen ince tabaka olup, karotenoid pigmentleri ve eteri yağ hücrelerini içerir. Eğer kabuk sıkıştırılır, bir darbe etkisinde kalır veya yüzeye iğne gibi bir cisim sokulursa, hücrelerin basınç altında tuttuğu yağ damlacıkları dışarı adeta fişkirarak çıkar. Bu maddeye kabuk yağı denir. Flavedo katmanının en dışında yani; meyvenin yüzeyinde, ince bir mum filmi bulunur ki bu epidermisi; yağmura, su kaybına ve mantari enfeksiyonlara karşı koruyan doğal bir bariyerdir. Flavedonun hemen altında; adeta devamı şeklinde, beyaz renkte, kalınca keçeye benzer bir katman olan albedo ise daha iri hücrelerden oluşmaktadır. Burada besin maddeleri ve suyu taşıyan damarlar yer almaktadır [3].

Meyve eti: Meyve eti yani endokarp radyal olarak yerleştirilmiş dilimlerden oluşur. Dilimler, paransim hücrelerinin birçoğunun yan yana gelmesiyle, içinde meyve suyu bulunan keseciklerden oluşan bir yapı gösterir. Dilim içindeki üst üste yığılı bu meyve suyu keseciklerini, yüksek moleküllü materyalden oluşmuş bir dilim zarı sarar. Dilimlerin etrafında dizildiği eksenin ortasına gelen bölgede, dilimler içinde çekirdekler veya çeşide göre, çekirdek izleri bulunur. Meyve olgunlaştıkça yine çeşide bağlı olarak meyve eti ile kabuğun sıkı bağlantısı pektolitik enzimlerin etkisiyle gevşer [3].

Turunçgil meyvelerinin tür ve çeşitlerine göre, kabuk ve meyve eti oranı çok değişmektedir. Bir genelleme yapılırsa; kabuk oranı %25-50, meyve eti oranı %50-75 civarında bulunmaktadır. Portakallarda ise meyvedeki kabuk oranının genellikle %50 civarında olduğu kabul edilmektedir. Kabuğun yaklaşık %30'unu flavedo, %70'ini albedo oluşturmaktadır [3].

2.1.3. Turunçgil Meyvelerinin İşlenmesi ve Sorunları

Turunçgil ürünlerinin büyük bir kısmı yaş meyve olarak tüketilmesinin yanında; meyvenin tamamı, meyve kabuğu ve meyve suyu işlenerek çeşitli teknolojik ürünler elde edilmektedir. Ülkemizde turunçgil meyvelerinden en çok meyve suyu ve konsantresi elde edilmekte ve diğer ürünlerin üretiminde de son yıllarda artışlar gözlenmektedir. Turunçgil suyu üretim prosesi genellikle meyve alım ve depolama, meyve yıkama ve sınıflandırma, meyve suyu ekstraksiyonu, finişing veya eleme, ısısal işlem, paketlenme ve depolamadan oluşur [6].

Turunçgillerden, ilk zamanlarda meyve suyu üretiminde yan ürün olarak sitrik asit, kabuk yağı, pektin, kurutulmuş kabuk, meyve püresi, şurup, şarap, sirke üretilmiştir. 1920'den sonra şişelenmiş meyve suyu, sirke, marmelat, reçel, jöle, ticari üretimine başlanılmıştır [7]. Turunçgil prosesinin en önemli yan ürünleri pulp, molaz, yıkantı pulp katısı ve esansiyel yağdır. Bazı modern işletmelerde atıklardan hesperidin, naringin, limonin, enzim, esans, kimyasal aroma vb. ürünler üretilmektedir. Bu ürünlerin üretilmesinde ultrafiltrasyon, reçine ile adsorpsiyon vb. yöntemler kullanılmaktadır. Molaz insan tüketimi için oldukça acı olmasına karşın ultrafiltrasyon ve iyon değiştirme teknolojisi ile acılık azaltılabilmektedir [9].

Kaliteli bir turunçgil suyunun üretimi için meyvenin yeterli olgunlukta hasat edilmiş ve belirli bir briks/asit oranına sahip olması gerekir. Briks/asit oranı sezona bağlı olarak 9 ile 15 arasında değişmektedir [6]. Kaliforniya'da yaş meyvenin toplanması için briks/asit oranının en az 8,1, Florida'da ise 10,1 olması istenmektedir. Diğer yandan Florida'da yaş meyve için bu oranın 10 olması yeterliyken meyve suyundaki briks/asit oranının en az 13 olması gerekmektedir. Turunçgil suyu tüketicisi briks/asit oranının Avrupa ülkelerinde 14, Kuzey Amerika'da 18 civarında ve genel olarak 15-18 arası olmasını tercih etmektedir[3, 6].

Ülkemizde yetiştirilen portakallarda briks/asit oranı genellikle düşük değerlerde olup 5,21-9,1 arasında değiştiği saptanmıştır. Çukurova Bölgesi'ndeki portakal çeşitlerinin meyve suyuna uygunluğu için yapılan bir çalışmada üç yılın ortalama

briks/asit oranı Hamlin için 7,7; Magnum için 8,1; Dörtyol Yerli için 6,7; Kozan Yerli için 8,0 ve Valensiya için 6,7 olarak belirtilmektedir [10].

Çizelge 2.1. Ülkemizde Üretilen Portakal Çeşitlerinin Nitelikleri [3]

Nitelikler	Çeşitler				
	Dörtyol yerlisi	Kozan yerlisi	Valencia	Hamlin	Magnum bonum
Meyve ağırlığı, g	103	144	128	140	119
Meyve suyu randımanı, %	42	48	42	45	44
Briks	12.8	13	12	11.5	11.3
Titrasyon asitliği, g/100 mL	1.96	1.66	1.84	1.50	1.41
Briks:asit oranı	6.7	8.0	6.7	7.7	8.1
pH	3.42	3.56	3.48	3.40	3.49
Askorbik asit, mg/100 mL	61	69	63	62	55

Meyve suyunun nitelikleri açısından; turunçgillerde tat dengesi (briks/ asit oranı), renk, askorbik asit içeriği, esansiyel yağ içeriği, bulanıklık derecesi ve stabilitesi, çökelen pulp miktarı ve acılık maddesi içeriği önemli parametreleri oluşturmakta ve bu parametreler meyve suyunun özelliklerini doğrudan etkilemektedir [8,11]. Ayrıca bunların yanında meyve suyu verimi, toplam asit miktarı, toplam çözünür kuru madde miktarı da turunçgil meyvelerinin önemli özelliklerdendir [3].

Turunçgil ürünlerinden elde edilen meyve sularında genel olarak sayılabilecek problemler;

- a. Kabuk yağı
- b. Çökme
- c. Bulanıklık stabilitesi
- d. Konsantrede jel oluşumu
- e. Aroma kaybı
- f. Renk kaybı

- g. Tağışış
- h. Acılık sayılabilir.

Flavonoidlerin bu maddelerden son ikisi ile ilgisi önemlidir. Dünyada gıdalardaki tağışışle ilgili olarak FDA tarafından 4 temel tip tağışış belirlenmiş olup bunlar;

- a- Kirli, pis, bozulmuş veya tehlikeli koşullar
- b- Güvenli olmayan veya sanitasyona uymayan koşullar
- c- Yasalar açısından güvenli olmayan koşullar
- d- Ekonomik tağışıştır [6].

Ekonomik tağışış yasalara uymayan ve etikette de belirtilmeyen malzemelerin kullanımını içerir. Çünkü ürünün, örneğin portakal suyu, nasıl üretildiği ve standardı açıkça ve tam olarak tanımlanmalıdır. Bu standartlar turunçgil sularının nasıl yapılacağını yada formüle edileceğinin yanında tağışışle ilgili düzenleme yapan tanımları da içerir [6]. Ekonomik tağışış endüstride 4 katagoride olabilmektedir;

- 1- Su eklenmesi,
- 2- Karbonhidrat eklenmesi,
- 3- Gizleme (amino asit tuzu , renklendirici eklenmesi vs)
- 4- Farklı meyve sularının ve ürünlerinin karıştırılması.

Elma, erik, beyaz üzüm, portakal pulp-yıkantı, greyfurt suyu ve diğer düşük fiyatlı veya pazar payı düşük turunçgil suları genellikle portakal suyu ve ürünlerine karıştırılarak ekonomik kara dönüştürülmektedir [6]. Florida'daki bazı portakal çeşitleri renksiz olarak belirtilmektedir. Oysa düşük oranlarda bile mandarin suyu eklenmesi rengi artırmaktadır [12]. Çoğunlukla %100 portakal suyuna %10 mandarin melezi veya mandarin suyu bu amaçla eklenmektedir. Elma, erik ve beyaz üzüm suyu izo sitrik testi veya daha kompleks içerik testleriyle; pulp-yıkantının eklenip eklenmediği de Florida'da benzoat testiyle kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Portakal suyunda greyfurt suyunun varlığı ise greyfurtun karakteristik bileşeni olan naringin testiyle bulunabilmektedir [6].

Turunçgil sularının karakterize edilmesinde polifenolik profil sıkça kullanılmaktadır. Mouly ve ark. [12] portakal ve greylfırttaki flavonoid bileşikleri analiz ederek bu profille tağşış olup olmadığını ve portakal çeşidini gözlemlemişlerdir.

2.2. TURUNÇGİL ÖRNEKLERİNDE FLAVONOIDLER VE NARİNGİN

Turunçgil meyvelerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda flavanon glikozitlerden hesperidin ve naringin; daha az miktarda da bazı flavonoidler bulunur. Olgun meyvenin toplam flavonoid konsantrasyonunun %30 - 50 si albedoda, %30 - 50 si göbek ve pulpta, %10 - 20 si flavedoda bulunur. Meyve suyunda ise %1-5 gibi en az düzeyde bulunur [7].

Bitkisel kökenli materyallerde bulunan fenolik bileşikler, “fenolik asitler” ve “flavonoidler” olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. “Flavan türevleri” ile de anılan flavonoidler, bitkisel fenoliklerin en büyük ve en önemli grubudur. Şimdiye kadar binlerce flavonoid bileşik tanımlanmıştır. Flavonoidler, difenilpropan iskeletine (C₆C₃C₆) dayanan kimyasal bir yapı gösterirler. İki fenil grubunu birbirine bağlayan 3 karbonlu köprü, genellikle oksijen ile halka yapmıştır. Flavonoidler;

- 1- Antosiyanidinler,
- 2- Flavonlar ve flavonoller,
- 3- Flavanonlar,
- 4- Katesinler ve löykoantosiyanidinler,
- 5-Proantosiyanidinler olmak üzere genellikle 5 alt gruba ayrılmaktadırlar [13].

Flavanon glikozitler, özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunmaktadır. Genel olarak, glikozitler acı tat veren maddeler olup, asit ve enzimlerle hidrolize olurlar, ancak alkalilerde kararlıdır. Glikozitlerin hidrolizasyonu sonucunda, şeker ve şeker dışında bir bileşik olmak üzere iki bileşen ortaya çıkmakta ve şeker dışındaki bileşene genel bir isim olarak “aglikon” denilmektedir [13].

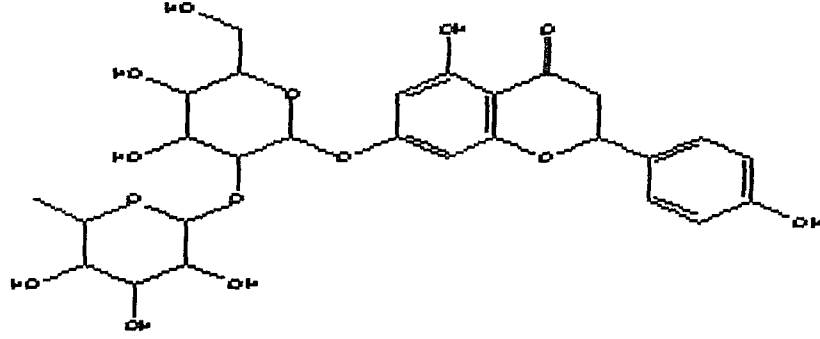
Flavanon glikozitlerden ileri gelen acılık, üründe mevcut olan ve birbirine bağlı iki şeker ramnoz ve glikozun bağ yapısına bağlıdır. 1-2 den bağlı flavanon neohesperidin acıdır fakat 1-6 bağı sonucu yapısal izomeri olan flavanon rutinosit tatsızdır [4].

Bazı turunçgillerden elde edilen ürünlerde, özellikle konsantre ve meyve sularında, hoşça gitmeyen bir acılık olmaktadır. Araştırmalar bu acılığın hatalı işleme beraber meyvenin kendi yapısından da kaynaklanabileceğini göstermektedir. Turunçgillerde iki tip acılık etmeninden söz edilebilir. Bunlar; flavonoidler (naringin, neohesperidin, ponsirin vb.) ve limonoidler (limonin ve nomilin) dir. Flavonoidler, turunçgil meyvelerinin endüstriyel olarak işlenmesinde teknolojik ve ekonomik bir öneme sahiptir [3]. Çünkü bu meyve sularının ve diğer ürünlerinin lezzetleri ve genel kabul edilebilirlikleri içerdikleri acılık maddesi ile ilişkilidir [14,15]. Turunçgillerde bileşim öğelerinden en önemli grubu acılık bileşikleri oluşturmaktadır. Acı olduğu için bazı turunçgil meyveleri işlenmemekte [3] ve bu yüzden de acılık giderme işlemi lezzetin ve ticari değerin artırılması için yaygın olarak araştırılan konuların başında gelmektedir [16,17]. Acılığın sorun olduğu turunçgil sularında naringin 50 mg/L düzeyinde dahi bulunsa, hissedilebilmektedir [6]. Bu nedenle turunçgillerde naringin, üzerinde en fazla araştırma yapılan flavonoidlerdendir.

Greyfurtların acı tadını veren “naringin” bir flavanon glikozit (neohesperidosit) olup, greyfurt, pummelo ve diğer turunçgil meyvelerinden “acı portakal” veya “ekşi portakal” denen bir portakal türü olan “*C. aurantium*” larda da bulunmaktadır [13]. Naringinin meyvedeki dağılımı meyvenin kabuk ve meyve suyuna göre değişmektedir. Naringinin gram cinsinden ağırlığınının meyveye oranını Ruby red’in (kırmızı greyfurt) albedosunda 0,22, flavedoda 0,02, pulpta 0,11 ve meyve suyunda 0,01 olarak toplamda 0,37 dir. Meyve olgunluğunun artmasıyla birlikte naringin miktarı düşmektedir [4].

Kimyasal yapısı Şekil 2.1’ de verilen naringin, kapalı formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$ olan beyaz kristal yapıda bir bileşiktir. Sudan kristalize edilmiş ve 6 mol su bağlı

naringinin erime noktası 83 °C ve sudaki çözünürlüğü 0,17 g/L dir; erime noktası 6°C ise sudaki çözünürlüğü 108g/L dir [7].



Şekil 2.1. Naringinin Kimyasal Yapısı

Naringin, neohesperidose (glucose + rhamnose, 2-pozisyonda) adlı acılık veren şekere sahipken; naringinin acı olmayan izomeri narirutin, rutinose (glucose + rhamnose, 6-pozisyonda) içerir. Naringin seyreltik mineral asit içerisinde naringenin, glikoz ve ramnoza hidrolizlenir [7].

Naringin, acılığı ve çözünürlüğünden dolayı, yiyecek ve içeceklerde acılık sağlanması için formülasyonlarda kullanılmaktadır. Naringinin sudaki tat eşiği 20 mg/L dir. Turunçgil aromalı tatlılarda ve diğer gıdalarda acılaştırma ajanı olarak 0,1-50 mg/L naringin eklenmesiyle damak tadı ayarlanabilmektedir [7].

Greyfurtlarda naringin, daha çok albedo, eksen ve dilim zarlarında bulunur. Hamken taze ağırlık üzerinden tüm meyvede 100 gramda 12100 mg düzeyinde bulunan naringin miktarının, olgunluk ilerledikçe 2195 mg kadar düştüğü saptanmıştır. Ekstraksiyon koşullarına ve meyve çeşidine göre ticari greyfurt sularında 73-419 mg/L düzeyinde naringin bulunmaktadır [3].

Naringin 1-1,5 cm çapındaki küçük altıntop meyvelerinde taze ağırlığın %10-20'sini, kuru madde esasına göre ise tüm meyvenin %40-75'ini oluşturmaktadır.

Naringin miktarı meyvenin çeşidine, büyüklüğüne, yetiştiği yere ve işleme tekniğine göre farklılık göstermekte olup altıntop meyvesi için 1,8-6,2 gram arasında değişmektedir. ABD'nin Florida eyaletinde üretilen altıntop sularının ortalama naringin içeriğinin %0,015-0,030 kadar olduğu bildirilmektedir [18]. Turunçgil sularındaki naringin miktarıyla ilgili ABD'de standart yoktur. Ancak, Florida yasasında (Florida Department of Citrus 1975, 20-64.097) A derecesinde greyfurt suyunda 600 mg/L den az ve B derecesinde greyfurt suyunda 750 mg/L den daha az naringin olması istenmiştir [6].

Acılık uçucu olmayan ana flavor niteliğindedir [4]. Greyfurt suyuyla özdeşleşen en önemli özelliği olan acılık, çoğu tüketici tarafından greyfurt suyunun sevilmemesine sebep olur [19]. Bazı greyfurt suyunda bir miktar acılığın istenmesine rağmen acılık, yine de bir problemdir [1,6]. Özellikle tatlı olması istenen portakal suyunda acılık kalitenin düşmesine neden olmaktadır [6].

Bronner ve Beecher [20] çalışmalarında portakal ve greyfurt suyu konsantrisindeki önemli flavonoidlerin seviyesinin belirlenmesi için bir işlem geliştirmişlerdir. İki farklı portakal türünde hesperidini 120 ve 150 mg/hg, narirutini ise 24 ve 30 mg/hg olarak bulmuşlardır. Farklı iki tür greyfurt suyu konsantrisinde ise 62-68 mg/hg narirutin ve 200 mg/hg naringin tespit etmişlerdir.

Ayrıca Bronner ve Beecher'in [20] bu çalışmasında flavonoidlerin meyve suyu ekstraktında baskın olma yüzdeleri greyfurt ve portakalda sırasıyla naringin 75-yok, narirutin 73-64/94 ve hesperidinin greyfurtta gözlemlenememişken portakaldaki değeri 32/92 olduğu görülmektedir.

Braddock, portakal, tangerin ve limon meyvesinde toplam hesperidinin gram cinsinden ağırlığının meyveye oranını sırasıyla 0,45, 0,42 ve 0,40 olarak belirtmiştir. Aynı tabloda bu meyveler için naringin değeri verilmezken greyfurt için de hesperidin değeri verilmemiştir. Greyfurtun Marsh cinsi için naringin 0,31 ve Ruby red için de 0,37 olarak belirtilmektedir. Genellikle turunçgil sularında naringinin varlığı greyfurt suyunun varlığını gösterir ancak naringin acı portakalda ve bazı

tangelo türlerinde de tespit edildiğinden, portakal suyunda greyfurt suyu taşımasının olup olmadığını anlamak için naringin tek başına yeterli olmamaktadır [7].

Coffin [21] yaptığı çalışmada flavanon glikozitleri portakal, greyfurt, limon ve misket limonu suyunda izole etmiş ve tanımlamıştır. Greyfurt suyunda 7-neohesperidosides, isosakuranetin 7-rutinosidi (portakaldakiyle aynı), hesperitin ve naringenin tespit etmiştir. Coffin [21] portakalda iki önemli flavanon glikozit olan hesperidin (hesperitin 7-rutinoside) ve naringin; düşük düzeyde de isosakuranetini; greyfurt suyunda ise altı farklı flavanon bileşikten en baskın olan naringin olmak üzere; naringenin 7-rutinoside, hesperidin, isosakuranetin 7-rutinoside ve neohesperidosidi, hesperetin, naringenin ve isosakuranetin olarak belirtmiştir.

Ross ve ark. [22] yaptıkları bir araştırmada ABD'deki 9 farklı ticari marka greyfurt suyunda flavonoid içeriğini incelemişler ve yaptıkları karşılaştırmada naringenin greyfurt suyunda en baskın flavonoid olduğunu ve düzeyinin 14,56-63,80 mg/100 ml olduğunu tespit etmişlerdir. Naringini en yakından takip eden narirutin ve hesperidin değerleri ise sırasıyla 2,25-12,2 ve 1,00-3,12 mg/100 ml'dir ve naringine göre çok düşük oranlardadır [22].

Mouly ve ark. [12] yaptıkları benzer bir çalışmada, naringin içeriğini ortalama olarak beyaz greyfurtta 331,3; pembe greyfurtta 159,1; kırmızı greyfurtta 275,4; yeşil greyfurtta 251,6 mg/L ve genel bir ortalama değeri olarak 246,8 mg/L saptamışlardır.

Castillo ve ark. [23] turuncun (*C. aurantium*) yaprak, çiçek ve meyvesinde naringin düzeyini araştırdıkları bir çalışmalarında yaprakta (130 mm uzunlukta) 3,83; çiçekte 4,56 ve saptta 1,55 $\mu\text{mol/g}$ yaş ağırlık değerlerine karşın meyvenin 10 mm çaplı halinde 56,07 $\mu\text{mol/g}$ taze ağırlık ve 25 mm çaplı halinde ise 49,39 $\mu\text{mol/g}$ taze ağırlık olarak tespit etmişlerdir.

Pupin ve ark. [24] yaptıkları bir çalışmada Brezilya'daki portakal suyu, konsantresi vb. ürünlerde flavanon glikozitlerden narirutin ve hesperidini analiz

ederek narirutini 16-142 mg/l ve hesperidini 104-537 mg/l olarak tespit etmişler ve hesperidinin narirutine oranının (ort.8,4) çeşide göre farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar Brezilya'daki marketlerden aldıkları portakal sularındaki flavanon glikozit içeriğine göre narirutini 9,1-94,8 ve hesperidini 105,8-586,6 mg/l olarak, doğal portakal meyvesine yakın değerler bulmuşlar ve taşıdığına karar vermişlerdir.

Castillo ve ark. [23] çalışmalarında FG den prunin (naringenin 7-O-glucoside) ve hesperetin 7-O-glucoside'i *C. aurantium*'dan ve *C. Paradisi*'den de prunini izole edip tanımlamışlardır. Ayrıca *C. aurantium* meyvesinin gelişimi boyunca hesperetin 7-O-glucoside ve pruninin kantitatif dağılımını, naringin ve neohesperidin seviyesine oranını da incelemişlerdir. Bunun sonucunda, bu meyvelerde doğal olarak bulunan hesperetin 7-O-glucoside'i *C. sinensis*'te tespit edememişler ve bu flavonoidlerin miktarının meyvenin olgunlaşmasıyla azaldığını belirtmişlerdir.

Swatsitang ve ark. [25] ise portakaldaki fenolik maddelerin tanımlanması ve izolasyonu için naringin, naringenin, hesperitin ve rutin dahil olmak üzere toplam 21 farklı fenolik maddeyi incelemişlerdir.

2.3. TURUNÇGİL ÜRÜNLERİNDE FLAVANON GLİKOZİTLERİN NİTEL VE NİCEL TAYİNİNDE KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLER

Turunçgil ürünlerinin kabuk ve meyve sularında flavanon glikozitlerin düzeylerinin saptanmasında bir çok analitik yöntem kullanılmakta ve bu yöntemlerin başında; kalorimetrik ve kromatografik yöntemler gelmektedir. Naringenin kalorimetrik analizi için genel olarak "Davis Testi (1947)" ve kromatografik analiz için ise "Fisher and Wheton (1976) Testi" esas alınmaktadır [17]. Ancak Davis Testi acı olan naringenin acı olmayan ve tatsız olan izomerleri narirutin ve diğer hidrolitik ürünleri arasındaki farkı göstermede yeterli duyarlılıkta değildir. Greyfurt suyundaki narirutin miktarı, naringin miktarının yaklaşık olarak %15-20 sini oluşturmaktadır [7]. Flavanon glikozitlerin analizinde 2ng/mL' ye kadar duyarlı olabilen ve aynı

anda birden fazla flavanonun analiz edilebildiği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi rutin analizlerde de oldukça kullanılmaktadır [14,16,17,24,26-28]. Aynı örnek içerisinde, birden fazla miktarda flavanon glikozitlerin (FG) birbirinden ayrılarak doğru bir şekilde tayin edilmesi HPLC yönteminin en önemli özelliklerinden birisidir [6].

Turunçgil meyvelerinde flavonoid bileşik ailesinden genellikle, flavanon glikozitler (FG) ve polimetoksillenmiş flavonlar (PMF) bulunur. HPLC tekniğiyle 6 FG (narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, didymin,poncirin) ve 6 adet PMF (sinensetin, hexamethoxyflavone, nobiletin, scutellarein, heptamethoxyflavone ve tangeretin) kantitatif tayini aynı anda sağlanabilmektedir [29].

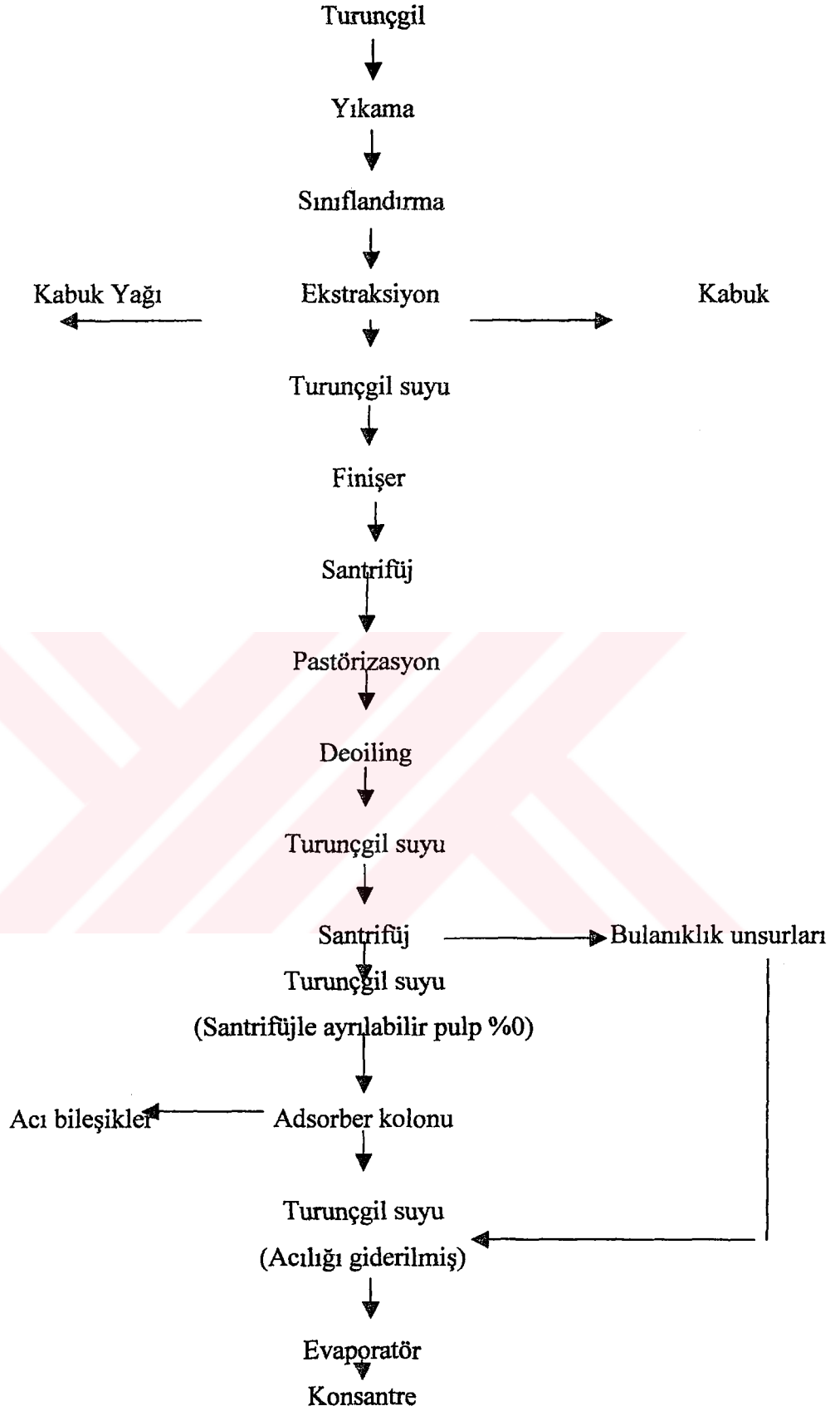
Günümüzde birçok gıda kalite kontrol laboratuvarında, turunçgil suyundaki hesperedin, neohesperedin, naringin ve narirutin miktarlarını doğru bir şekilde ölçülebilmesi için HPLC metodu kullanılmaktadır [7].

Diğer yandan HPLC metoduyla, turunçgil işleme sektöründe, kalite kontrol için doğru, anlık ve hızlı sonuç elde edilebileceği gibi tüm turunçgil meyveleri ve portakal çeşitleri karakterize edilebilmektedir.

2.4. TURUNÇGİL ÜRÜNLERİNDE NARİNGİN MİKTARININ AZALTILMASI

Acılığın giderilmesi turunçgil suyunda ticari değerin artırılması ve kalite kontrol için önemli bir işlemdir [17]. Literatürde naringinden kaynaklanan acılığın giderilmesine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır. Naringinin giderilmesinde kullanılan yöntemler, fizikokimyasal ve biyoteknolojik olarak incelenebilir.

Fizikokimyasal yöntemler; ultrafiltrasyon, adsorbent reçine kullanımı, süperkritik karbondioksit kullanımı sayılabilir [16,19]. Meyve suyu ve içecek endüstrisinde farklı amaçlarla adsorbent teknolojilerinden yararlanılmaktadır [3]. Meyve suyu endüstrisinde adsorbent olarak sadece adsorpsiyon veya iyon değişirme özelliği olan çeşitli materyallerin kullanılması olanağı vardır.



Şekil 2.2. Turunçgil Sularında Acılık Giderme İşlemi [3]

Bunların başlıcaları,kömür ve kömür türevleri, PVPP, poliamidler ve çeşitli reçinelerdir. Bunların bazılarının rejenerasyonu çok zordur veya ekonomik olarak mümkün değildir. Dünyanın bazı yerinde adsorbent kullanılarak acılık giderilmeye çalışılmaktadır. Ancak adsorbentlerin kullanımının sakıncalı ve yasal olmadığı ülkelerde yeni yöntem arayışı enzim kullanımının önemini artırmaktadır [17] ve naringinin giderilmesi için uygulanan aşamalar Şekil 2.2’de verilmiştir[3].

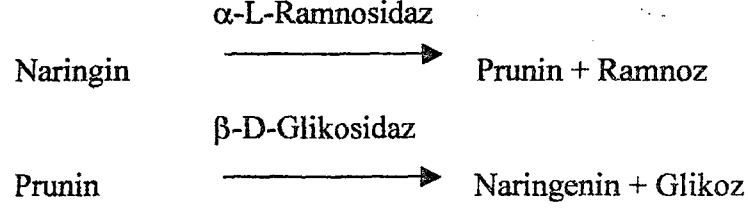
İyon değiştirici reçineler, kolaylıkla rejenere edilebilmelerine karşın bunlar meyve suyunun mineral kompozisyonunu değiştirdiklerinden bu alanda kullanılmaları yasaktır. Ayrıca reçinelerin kullanılmasında, meyve suyunun pulptan arınmış ve olabildiğince berrak olması gerekmektedir. Bu amaçla meyve suyunun pulpu santrifüjle etkin bir şekilde ayrıldıktan sonra adsorbent uygulanmaktadır [3]. Asitlik, tatlılık, flavor ve bulanıklık kaybı, adsorpsiyon tekniğinin verimini düşürmektedir. Bu yüzden enzimatik hidroliz, endüstriyel uygulamada daha yüksek potansiyele sahiptir [17].

Fizikokimyasal yöntemlerin kullanılmasında bazı sınırlamalar ve dezavantajlar olduğundan dolayı biyoteknolojik yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Biyoteknolojik yöntem olarak mikroorganizma [30] veya enzim kullanılmaktadır [14,16,26-28,31].

2.4.1. Naringinin Enzim Kullanılarak Giderilmesi

Bugün enzimler, çoğu endüstriyel uygulamada sıklıkla kullanılmaktadır ve gün geçtikçe daha kararlı, aktivitesi yüksek özel enzimlere gereksinim artmaktadır. Bu enzimler tekstil, temizlik, kağıt gibi sektörlerin yanında şarap, bira ve meyve suyu üreten gıda endüstrilerinde de uzun yıllardır kullanılmaktadır. Dünyada, endüstride kullanılan enzimlerin %75’ini hidrolazlar ve ikinci büyük grubunu da karbonhidrolazlar oluşturmaktadır. Bu enzimlerin %60’ını Avrupa, kalan %40’ı da ABD ile Japonya üretmektedir [32].

Naringini enzim kullanarak hidrolize etmek için naringinaz enzimi kullanılmaktadır. Naringinaz, α -L-ramnosidaz ve β -D-glikosidaz içeren, hidrolaz özellikte bir enzimdir. Böylece naringini, naringenine, glikoza ve ramnoza hidrolize eder [33].



Tsen [33] *Aspergillus niger*' dan elde edilmiş olan naringinazı glutaraldehit ve sodyum borohidritle çitin üzerine tutuklayarak, meyve suyunun acılığının giderilmesi sırasında naringinaz enziminin aktivitesini düşüren etkenleri incelediği bir çalışmada, model meyve suyundaki naringinin giderilmesi için kullanılan naringinazın veriminin, doğal meyve suyu kullanıldığında düştüğünü saptamış ve doğal meyve suyundaki bazı bileşenlerin, naringinazın aktivitesini düşürdüğünü tespit etmiştir. Tsen [33], ayrıca sitrik asitin doğal enzim için pH 3,0 da, immobilize enzim için ise hem pH 3,0 hem de 4,5 ta; glikoz, fruktoz ve ramnozun ise doğal ve immobilize naringinaz için, hem pH 3,0 hem de 4,5 te inhibitör etki yaptığını belirtmektedir. Sukroz, pektin ve hesperedinin inhibiör etki göstermediği, glikozun inhibitör etkisinin fruktoz ve ramnozdan daha yüksek olduğu da bu çalışmada belirtilmektedir [33].

Tsen [33], naringinazı bir kolona tutukladığı çalışmada meyve suyunun sirkülasyonuna bağlı olarak naringini en fazla birinci akışta giderebilmiş (%32-36) ve sirkülasyon artıkça enzim aktivitesinin düştüğünü saptamıştır.

Jimeno ve ark. [14], meyve suyundaki acılığı giderebilmek için naringinazı glikofaj kaplı gözenekli cam üzerine tutuklayarak naringini substrat olarak kullanılmış ve enzimin dolgulu-yataklı reaktörde çalışma koşullarını belirlemeye çalışmışlardır. Dolgulu-yatak reaktör, doğal greyfurt suyu ile beslenildiğinde de yüksek kararlılık gösterdiği ancak meyve suyunda askıda kalan katı maddelerden ve bulanıklıktan dolayı kolonda tıkanıklık olduğu belirtilmektedir. Bunu önlemek için

ise klarifikasyon işlemi önerilmektedir. Çünkü Jimeno ve ark. [14], çalışmalarında kolonun beslendiği substrat kaynağı ile sürekli işlem süresini karşılaştırmışlar ve 0,345 mM naringin için 450 saat; model meyve suyu için 136 saat, klarife edilmiş meyve suyu için 145 saat ve doğal meyve suyu için ise yalnızca 24 saat boyunca immobilize enzimin kararlılık gösterebildiğini tespit etmişlerdir.

Tsen ve Tsai [26], *Penicillium sp.* ve *Aspergillus niger*' dan elde edilmiş olan naringinaz enzimlerinin kinetikleri ve şekerlerin bu enzimlerin aktivitesine etkisini araştırmışlardır. Linewear-Burk eğrisine dayanılarak glikoz, fruktoz ve ramnozun *Penicillium sp.* kaynaklı naringinaz için yarışmacı, fakat aynı enzimin *A. niger* kaynaklı olanı için ise yarışmacı olmayan inhibitörler olduğu belirtilmektedir. Tsen ve Tsai [26] çalışmalarında ayrıca sitrik asitin %8' in (w/v) altındaki konsantrasyonda her iki enzimin de aktivitesi için önemli bir etki yapmadığı ve önceki çalışmanın aksine ramnozun her iki enzim için de glikozdan daha fazla inhibitör etki yaptığını saptanmıştır. Çitin üzerine tutuklanan *Penicillium sp.* kaynaklı naringinaz, kullanıldığında, doğal meyve suyunun pH aralığında (3,0-3,4) daha kararlı olmuş ve işlemde yaklaşık %75-80 maksimum aktivite göstermiştir [26].

Penicillium sp. kaynaklı naringinazı selüloz triasetat üzerine tutuklayarak kolon reaktörde enzim aktivitesini inceleyen Tsen ve ark. [28], kinetik çalışmalarında tutuklanmış enzimin doğal enzime göre daha yüksek ısıl stabilitesinin ve K_m değerinin olduğunu belirtmektedirler.

Tsen ve Yu [31], greyfurt suyundaki iki önemli acılık maddesi olan naringin ve limonini aynı anda giderebilmek için, limoninin adsorplanabileceği ve naringinin de hidrolize olabileceği bir sistem olarak selüloz monoasetat ve selüloz triasetata *Penicillium sp.* kaynaklı naringinazı tutuklamışlardır. Greyfurt suyunun acılığı enzim kolonu kullanılarak giderildiğinde meyve suyunun şeker bileşikleri, toplam organik asit ve bulanıklığında değişme olmadığı ve aynı zamanda greyfurt suyundaki naringinin %35 ve limoninin %58 kadarının giderilebildiği belirtilmektedir [31].

Soares ve Hotchkiss [27], çalışmalarında *Penicillium sp.* kaynaklı naringinazı paketleme filmi olarak selüloz asetata tutuklamışlar ve 7°C de, %23 verim elde etmişlerdir. Kinetik çalışmaları sonucu araştırmacılar, tutuklu enzimin aktivasyon enerjisinin (11,0 Kcal/mol) ve K_m değerinin (2,1 mM), doğal enzimin değerlerinden (14,2 Kcal/mol ve 3,6mM) düşük; optimum pH değerinin ise yüksek olduğunu (tutuklu enzim için pH 4,0 ve doğal enzim için pH 3,5) bildirmektedirler [27].

Chien ve ark. [17], naringinazın içerdiği α -L-ramnosidaz ve β -D-glikosidazın tek başlarına naringini hidrolize etmedeki etkilerini naringinazla karşılaştırmışlardır. α -L-ramnosidaz ve β -D-glikosidazın ayrı ayrı fakat peş peşe meyve suyuna verilmesinin, acılığın gidermede bu enzimlerin karışımı olan naringinazla aynı etkiye sahip oldukları saptanmıştır [17]. Araştırmacılar, ayrıca *Escherichia coli*'den klonlanan daha ekonomik α -L-ramnosidazı içeren naringinazın endüstriyel kullanıma uygun bir enzim olduğunu belirtmektedirler [17].

2.4.2. Enzim Kinetiği

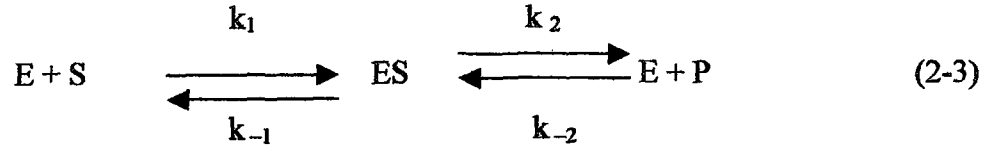
Enzim reaksiyonlarının kinetikleri üzerine ilk çalışmalar 19.yy sonlarında yapılmıştır. 1903 yılında Henri tarafından enzim reaksiyonları için önerilen hız eşitliği aşağıda görüldüğü gibidir [34].

$$V = \frac{K[S]}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (2-1)$$

Henri eşitliğine göre reaksiyon hızı, enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Ancak substrat derişimi ile artışı doğru orantılı değildir ve hız bir maksimum değerle sınırlanmaktadır. 1913'te Michaelis ve Menten adlı araştırmacılar Henri eşitliğini biraz değiştirerek aşağıdaki denklemi elde etmişlerdir [34,35].

$$V = \frac{k_2[E_0][S]}{K_s + [S]} \quad (2-2)$$

Michaelis-Menten kuramına göre bir enzimatik reaksiyonda, enzim (E) önce substrat (S) ile birleşerek enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturmakta ve bu ES kompleksi de ayrılarak enzim ve ürüne dönüşmektedir. Oluşan reaksiyon iki yönlü bir reaksiyon olup aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir [35].



Önerilen 2-1 ile 2-2 nolu eşitlikler ve 2-3 nolu reaksiyonda;

E_0 : Reaksiyona katılan toplam enzimi,

P: reaksiyon sonucu oluşan ürünü,

k_1 : ES kompleksinin oluşum hız sabitini,

k_{-1} : ES kompleksinin E + S' ye yıkılma hız sabitini,

k_2 : E + P'nin oluşum hız sabitini,

k_{-2} : E + P'nin ES kompleksine yıkılma hız sabitini,

K_s : ES kompleksinin ayrışma sabiti ($= k_{-1}/k_1 = [E][S]/[ES]$),

K: enzime bağlı sabitini ($= k_2[E_0]/K_s$),

V: Enzimatik reaksiyonun hızını göstermektedir. Reaksiyon hızı substrat ve ürünün zamanla değişimine bağlı olarak 2-4 ve 2-5 nolu eşitliklerde olduğu şekilde ifade edilebilmektedir [34].

$$V = \frac{-d[S]}{dt} \cong \frac{-\Delta[S]}{dt} \quad (2-4)$$

$$V = \frac{d[P]}{dt} \cong \frac{\Delta[P]}{dt} \quad (2-5)$$

Enzim için kütle denkliği yapıldığında ortamda serbest halde bulunan enzim (E) ile ES kompleksinde bulunan enzim toplam enzimi (E_0) oluşturmaktadır [34-36].

Buna göre;

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2-6)$$

$$[E] = [E_0] - [ES] \text{ dir.} \quad (2-7)$$

Eşitlik 2.3 ile gösterilen enzimatik bir reaksiyonda ES kompleksinden E + P oluşumu gerçekte tersinir bir olaydır. Ancak reaksiyonun başlangıç hızı dikkate alındığında E+P'den ES oluşumu çok düşük düzeyde olduğu için ihmal edilmektedir. Bu durumda [ES]'nin oluşum hızı:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] = k_1([E_0] - [ES])[S] \quad (2-8)$$

[ES]'nin yıkılma hızı ise:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \text{ dir.} \quad (2-9)$$

Bu enzimatik reaksiyon dengeye ulaştığında, [ES]'nin oluşumu yıkımına eşit olup (2-8) = (2-9) olmaktadır. Buna göre;

$$k_1([E_0] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2-10)$$

$$k_1[E_0][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1[E_0][S] = k_1[ES][S] + (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1[E_0][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S] + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}} \quad (2-11)$$

eşitliği elde edilir. Eşitlikte;

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2-12)$$

terimi Michaelis-Menten sabiti olarak tanımlanmaktadır [34-36].

Belirli şartlarda enzimatik reaksiyonun hızı (V), [ES]'nin E + P'ye dönüşüm hızına (ürün oluşum hızı) eşit olmaktadır.

$$V = k_2 [ES] \quad (2-13)$$

Eşitlik 2-13' de, [ES] yerine eşitlik 2-11 ve 2-12 konulduğunda aşağıdaki eşitlik oluşmaktadır.

$$V = \frac{[E_0][S]k_2}{[S] + K_m} \quad (2-14)$$

Enzimatik reaksiyonun sonunda bütün enzim substrat ile bağlanarak, enzimin tamamının [ES] kompleksine dönüştüğü ve ortamda serbest halde enzim kalmadığı durumda hız, maksimum olmaktadır. Bu durumda;

$$V_m = k_2 [E_0] \text{ olur.} \quad (2-15)$$

Bu eşitlik 2-14' te yerine konulduğunda Michaelis-Menten hız eşitliği elde edilmektedir [34,35].

$$V = \frac{V_m [S]}{[S] + K_m} \quad (2-16)$$

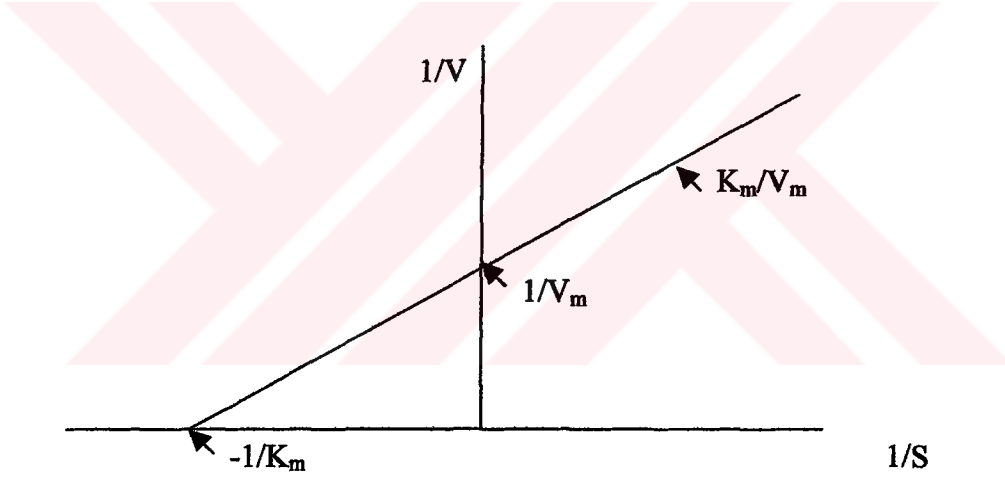
Michaelis-Menten, substrat konsantrasyonunun enzimatik bir reaksiyon hızına etkisinden hareketle [S] ve K_m 'e bağlı hız eşitliğini türetmişlerdir. K_m , maksimum hızın yarısına ulaşmak için harcanması gereken substrat derişimidir. K_m , bir enzimin substratına olan ilgisini göstermektedir. Eğer enzimin substratına ilgisi fazla ise K_m değeri küçük olup düşük substrat derişimlerinde bile enzim ile substrat, [ES] ara kompleksini oluşturabilmektedir. Enzimin substratına ilgisi zayıf ise K_m değeri büyük olmaktadır [34-36].

Michaelis-Menten hız eşitliği hiperbolik bir eğrinin denklemdir. Bu nedenle, bir enzimatik reaksiyondaki V_m ve buna bağlı olarak K_m değerlerini kesin ve doğru

belirlemek için, özellikle V_m noktası yakınında çok sayıda $[S]$ konsantrasyonunun denemeye alınması gerekmektedir. Pratikte bunu bir doğru denklemine dönüştürmek işleri daha kolay hale getireceğinden bu denklem tersine çevrilip çarpanlarına ayrılmış ve I. dereceden doğru denklemi olan $y = ax + b$ formunu alarak Michaelis-Menten eşitliği Lineweaver-Burk denklemine dönüştürülmüştür [34-36].

$$\frac{1}{V} = \frac{[S] + K_m}{V_m [S]} = \frac{[S]}{V_m [S]} + \frac{K_m}{V_m [S]} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} \quad (2-17)$$

Lineweaver-Burk hız formunda $1/V$ ' ler $1/S$ ' e karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 2.1' de görüldüğü gibi V_m ve K_m değerlerini belirlemek mümkün olmaktadır. Doğrunun dikey eksenini (y eksenini) kestiği nokta $1/V_m$, yatay eksenini (x eksenini) kestiği nokta ise $-1/K_m$ ' i vermektedir [36].



Şekil 2.3. Lineweaver-Burk Hız Eğrisi

Bu eşitliklerden de görüleceği üzere enzim katalizli reaksiyonun hızını substrat ve enzim derişimi etkilemektedir. Ayrıca pH, sıcaklık, su aktivitesi, reaksiyon süresi, reaksiyon ürünleri, enzim inhibitörleri ve aktivatörleri, basınç, ışık vb. gibi etkenler enzimatik reaksiyonun hızını etkileyen diğer faktörlerdir [34].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hammadde ve Alet-Ekipman

Akdeniz Bölgesi sınırları içinde bulunan İçel, Hatay, Antalya ve Adana illeri sınırlarını kapsayan çeşitli üretim alanlarından [Çizelge 3.1’de belirtilen tür ve çeşitlerde turunçgil meyveleri (Citrus L.)], turunçgil türünün olgunlaşma ve hasat edilme periyoduna bağlı olarak mevsimin başı ve sonunda olmak üzere iki defa ve yaklaşık 2 kg örnek alınarak laboratuara getirilmiş ve analiz edilinceye kadar +5°C de buzdolabında bekletilmiştir. Çalışmada kullanılan portakal ve greyfurt konsantre örnekleri, yaklaşık 50 brikste ticari amaçla üretilmiş olarak bir firmadan sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Turunçgil Meyvelerinin Tür, Çeşit ve Örnek Alınan Bölgeleri

Meyve Adı	Meyve Cinsi	Bölge	Örnek Sayısı
Portakal	Yerli	Adana	13
		Antalya	5
		Hatay	5
		İçel	6
	Washington	Adana	8
	Navel	Antalya	7
		Hatay	8
		İçel	28
	Yafa (Shamouti)	Adana	3
		Hatay	5
İçel		9	
Mandarin	Mineola	Adana	9
		İçel	6

Çizelge 3.1. (devam)

Meyve Adı	Meyve Cinsi	Bölge	Örnek Sayısı
Mandarin	King	İçel	4
Limon	Kütdiken	İçel	5
Turunç		İçel	2
Greyfurt	Beyaz	İçel	2
	Pembe	İçel	3
	Kırmızı	İçel	3

Bu çalışmada Shimadzu marka LC-10ATVP model Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmış olup, kromatografik koşullar Çizelge 3.2' de ve diğer alet-ekipmanlar ve özellikleri Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan HPLC Sisteminin Özellikleri

HPLC sistem adı	Özellikler
Ayırıcı kolon	: Merck, C18 HD 250/4 Nucleosil 100-5 ET250/4 Nucleosil, 120-7
Pompa	: FCV-10ALVP
Kolon fırın	: CTO-10ASVP model; 40 °C' ye ayarlanabilen
Dedektör	: UV/Visible dedektör (280 nm ye ayarlanabilen, Diod Array dedektör)
Hareketli faz	: Asetonitril, su, asetik asit 200/800/0,5 v/v/v
Akış hızı	: 1,0-1,5 ml/dk
İntegratör	: Hewlett Packard bilgisayar; Pentium III

Çalışmada kullanılan kimyasallar; naringin (Sigma, N-1376, minimum %95 saflıkta), naringinaz (Sigma, N-1385), asetonitril, asetik asit, dimetilformamid (DMF), amonyum oksalat ve sodyum asetat analitik saflıkta Merck firmasından temin edilmiş olup çözeltilerin hazırlanmasında Millipore Milli Q saf su cihazından

elde edilen ultra saf su kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin özellikleri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Diğer Alet-Ekipmanlar ve Özellikleri

Alet-ekipman adı	Özellikler
Refraktometre	: Bellingham+Stanley, RFM340; su banyolu (Haake, K15), termostatlı (Haake, DC3)),
Santrifüj	: Nüve, NF815
Terazi	: Chyo, MP-300
Analitik terazi	: Sartorius, A200s; 0,0000 hassasiyette
Manyetik karıştırıcı ısıtıcı	: Monotherm-Variomag
Su banyosu	: Heidolph, Laborato rotary evaporator
Vakum pompası	: KNF Neuberger, D-79112
PH metre	: Hanna, HI 8314
0,45 µm selüloz nitrat filtre	: Sartorius, 13906-50-AJN
0,45 µm hijyenik naylon filtre	: Minisart Sartorius, N 16555

Hareketli faz: 200 ml saf asetonitril, 800 ml su ve 0,5 ml asetik asit (%95,5 ve 1,05 kg/ml) karışımı filtre edilerek kullanıldı.

DMF/0,01 M HAc çözeltisi (20/80 v/v): 0,01 M HAc hazırlamak için 0,570 ml HAc alınarak 1000 ml hacimli balon jöjeye konuldu ve hacmine saf suyla tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 800 ml alınıp 1000 ml hacimli balon jöjeye konularak hacmine DMF ile tamamlandı.

Naringin stok çözeltisi (1000 mg/L): 0,1053 mg naringin tartularak 100 ml lik balon jöjeye konuldu ve hacmine DMF/0,01 M HAc çözeltisi ile tamamlandı. Hazırlanan stok çözelti +4°C de 30 gün boyunca muhafaza edildi.

Standart naringin çözeltileri: Stok çözeltinin DMF/0,01 M HAc ile uygun şekilde seyreltilmesiyle 0-1250 mg/L standart çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltiler HPLC aletine verilmeden önce günlük hazırlandı.

Naringinaz stok çözeltisi (1000 mg/L): 100 mg naringinaz tartılarak 100 ml lik balon jojeye konuldu ve hacmine tampon çözeltisi ile tamamlandı. Daha sonra balıklı magnetik karıştırıcıda 5-15 dk karıştırıldı. 2000-4000 devir/dk hızdaki santrifüjde 5 dk tutularak çözeltideki çözünmeyen tortu ayrıldı. Hazırlanan bu stok çözelti +4 °C de muhafaza edildi.

Amonyum oksalat çözeltisi (0,025 M): 3,55 g di-amonyum-oksalat monohidratın, $C[(NH_4)_2C_2O_4H_2O]$, 1000 ml damıtık su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlandı.

Tampon çözeltisi (0,1 M sodyum asetat tamponu): 0,1 M sodyum asetat çözeltisi hazırlamak için 13,608 gram sodyum asetat anhidrat (82,03 gr/mol) tartılarak 1000 ml hacimli bir balon jojeye konuldu ve hacmine saf su ile tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH' sı 3,5, 4,0 ve 4,5 değerine pH metre yardımıyla derişik saf Hac eklenerek ayarlandı.

3.2. METOT

3.2.1 Turunçgil Meyvelerinden Meyve Suyu ve Kabuk Suyunun Elde Edilmesi

Laboratuara getirilen yaklaşık 2 kg lık her bir meyve (portakal, turunç, mandarin, greyfurt ve limon) bir bıçak yardımı ile enine ikiye bölündükten sonra elektrikli narenciye sıkacağında sıkıldı ve böylece taze meyve suyu elde edildi. Elde edilen meyve suyu 250 ml lik kapaklı kavanozlara konulduktan sonra su banyosunda 90 °C de sürekli karıştırılarak 1 dk bekletildi. Su banyosundan çıkarılan kavanozlar, kapakları kapatılarak hızlı bir şekilde (musluk suyu altında) 15-20°C' ye kadar soğutuldu ve bu şekilde hazırlanan örneklerin kimyasal analizi yapıncaya kadar -18°C' de derin dondurucuda saklandı.

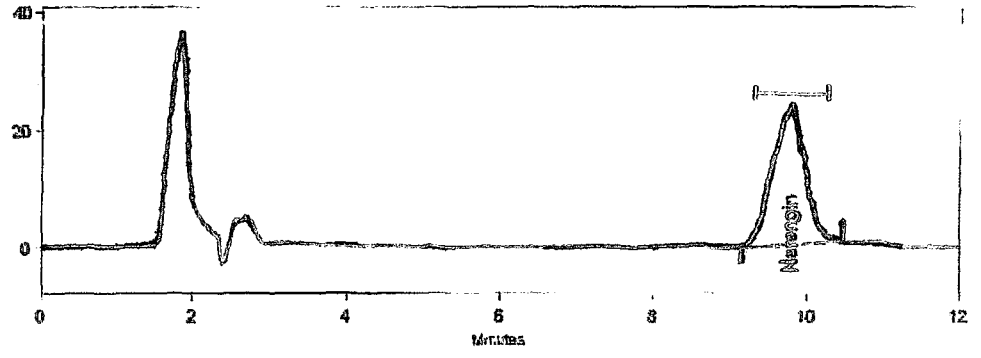
Meyve suyu alınmış ürünün iç kısmındaki dilim zarları iyice giderildikten sonra kalan kısım bir bıçak yardımı ile çeşitli büyüklüklerde parçalara ayrıldı ve homojen püre şekline gelinceye kadar blendırdan geçirildi. Elde edilen püre, 300 mesh lik tel elekten süzüldü. Bu şekilde elde edilen ürün kabuk suyu olarak adlandırıldı. Bu kabuk suyuna, meyve suyuna uygulanan işlemler tekrarlandı.

3.2.2. Meyve ve Kabuk Suyunda Naringin Tayini

Bölüm 3.2.1 deki şekilde hazırlanan meyve ve kabuk suyu, briksi 11.8'e ayarlanan konsantre örneklerinin her birinden 10,00 gram tartıldı ve 50 ml lik bir balon jofeye aktarıldı. Üzerine 10 ml 0,025 M amonyum oksalat ve 10 ml DMF eklendi. Karıştırıcıda bir 1-2 dk karıştırıldıktan sonra örnek hacmi saf suyla tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda tekrar iyice karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti 90 °C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dakika tutulduktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Soğutulan çözelti 0,45 µm lik filtreden geçirildikten sonra bir mikro enjektör yardımı ile 20 µl lik bir hacim HPLC cihazına enjekte edildi.

Standart naringin çözeltilerine (0,5–1250 mg/L naringin) aynı işlemler uygulanarak, her bir standart derişimine karşılık gelen pik alanları yardımı ile bir kalibrasyon grafiği elde edildi. Elde edilen kalibrasyon grafiği yardımı ile de örneklerdeki naringin düzeyleri mg/L olarak belirlendi. Şekil 3.1' de HPLC aletinden elde edilen standart naringine ait kromatogram görülmektedir.

Ayrıca çözünebilir kuru madde briks cinsinden refraktometre ile; örneklerin pH ları pH metre ile doğrudan ölçüldü.



Şekil 3.1. Standart Naringin Kromatogramı

3.2.3. Naringinaz Enzimi ile Naringin Miktarının Azaltılması

3.2.3.1. Naringinaz Aktivitesinin Tayini

On ml lik bir reaksiyon kabına; 5 ml asetat tampon çözeltisi (pH 4,0) ve 1000 mg/L' lik naringin stok çözeltisinden 2 ml konuldu, reaksiyon kabı iyice karıştırıldıktan sonra 60°C sıcaklığa ayarlı su banyosuna yerleştirildi ve bu sıcaklıkta 5 dk bekletildi. Çözelti sabit sıcaklığa geldikten sonra 1000 mg/L lik naringinaz enziminden 3 ml eklendi ve reaksiyon süresi başlatıldı. Farklı sürelerde reaksiyon çözeltisinden 20µl örnek alınıp HPLC aletine doğrudan enjekte edilerek naringin derişimi Bölüm 3.2.2 deki şekilde tayin edildi. Bu işlem, çalışmada kullanılan farklı naringin (50-300 mg/L) ve naringinaz (50-600 mg/L) karışımlarında farklı pH (3,5, 4,0 ve 4,5) ve sıcaklıklar (40, 50 ve 60°C) için tekrarlandı.

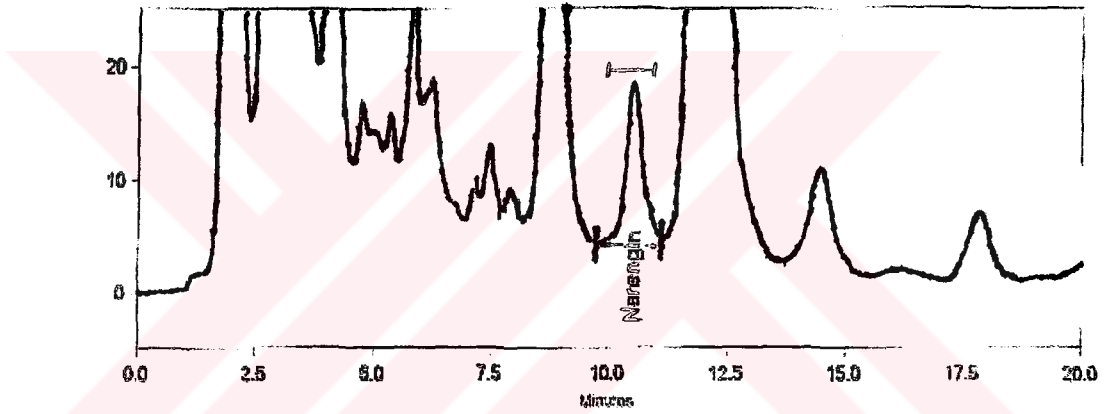
3.2.3.2. Naringinaz Enzimi ile Portakal ve Greyfurt Meyve Sularında Naringin Miktarının Azaltılması

10,00 gram meyve suyu tartıldı ve bir reaksiyon kabına konuldu ve 60 °C lik su banyosunda 5 dk bekletildi. Bu süre sonunda üzerine çözeltideki enzim derişimi 300 mg/L olacak şekilde stok naringinaz çözeltisinden eklendi ve reaksiyon süresi başlatıldı. Farklı sürelerde reaksiyon çözeltisinden 20µl örnek alınıp HPLC' ye doğrudan enjekte edilerek naringin derişimi Bölüm 3.2.2' deki şekilde tayin edildi.

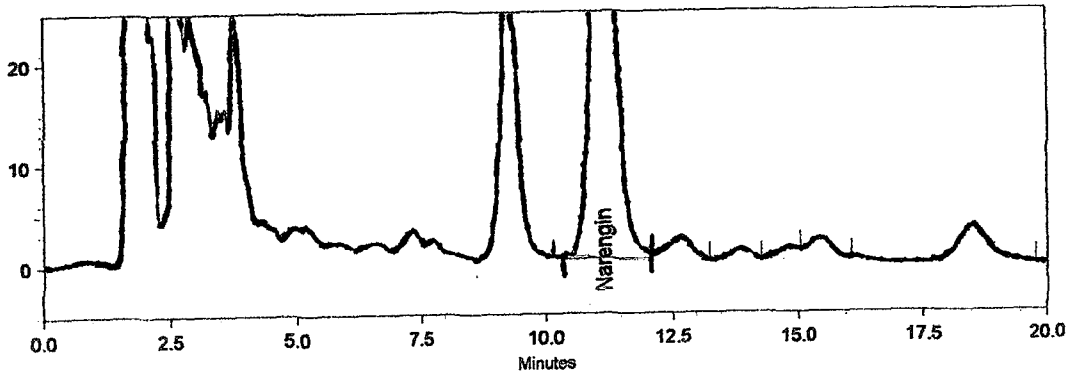
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. AKDENİZ BÖLGESİ'NDE YETİŞEN TURUNÇGİL MEYVELERİNİN BAZI TÜR VE ÇEŞİTLERİNİN NARINGİN DÜZEYİ

Akdeniz Bölgesi'nde çeşitli alanlarda yetişen turunçgil meyvelerinden toplam 97 adet portakal (51 adet Washington, 17 adet yafa, 29 adet yerli), 19 adet mandarin, 5 adet limon, 2 adet turunç ve 8 adet greyfurt meyvelerinin taze kabuk ve suyunda naringin, HPLC' de tayin edilmiştir. HPLC' den elde edilen portakal cloudy ve greyfurt konsantresine ait kromatogramlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de; tespit edilen bazı naringin değerleri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Portakal Cloudynin Kromatogramı



Şekil 4.2. Greyfurt Konsantresinin Kromatogramı

Çizelge 4.1. Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Turunçgil Meyvelerinin Bazı Tür ve Çeşitlerinin Naringin Düzeyi (mg/L)

Bölge	Meyve Cinsi	Örnek sayısı	Taze Meyve Suyu				Meyve Kabuk Suyu			
			Aralık	Ortalama	Std Sapma	Örnek sayısı	Aralık	Ortalama	Std Sapma	
Adana	Washington Navel	5	0.18-0.48	0.31	0.14	6	2.6-9.73	6.22	3.18	
	Shamouti	-	-	-	-	3	3.27-4.93	4.10	0.83	
	Yerli	7	0.51-1.2	0.74	0.23	13	1.88-10.5	4.78	2.94	
Antalya	Washington Navel	4	0.16-0.96	0.46	0.37	6	1.38-9.08	5.24	2.69	
	Yerli	3	0.16-2.63	1.28	1.25	4	3.50-9.53	6.27	2.82	
Hatay	Washington Navel	4	0.12-0.71	0.37	0.25	5	3.56-15.7	7.15	4.87	
	Shamouti	2	0.12-1.03	0.58	0.64	3	1.63-6.39	4.71	2.67	
	Yerli-	-	-	-	-	4	1.63-13.00	5.46	5.20	
Mersin	Washington Navel	19	0.16-1.52	0.71	0.33	27	0.5-14.24	5.50	3.51	
	Shamouti	5	0.23-1.55	0.64	0.52	9	0.7-12.23	6.55	3.34	
	Yerli	4	0.58-1.19	0.85	0.25	6	1.61-9.04	5.50	3.01	
Adana	Mandarına/Mineola	4	0.14-0.85			8	5.03-16.14			
Mersin		4	0.13-0.54			6	4.74-16.45			
Mersin	Turunç	2	124,52-325,3			2	1399,62-1568,50			
Mersin	Greyfurt/ Beyaz	2	322,25-423,82			2	3462,8-3879,42			
Mersin	Greyfurt/ Pembe	3	308,3-478,74			3	3192,7-4385,72			
Mersin	Greyfurt/Kırmızı	3	479,69-510,07			3	4439,68-7024,79			

Çizelge 4.1' de görüleceği gibi; 86 adet portakal kabuğundaki naringin düzeyleri 0,50-15,70 mg/L aralığında; 53 adet portakal suyundaki naringin düzeyleri 0,12-2,63 mg/L aralığında saptanmıştır. Üç farklı portakal çeşidinde naringin düzeyleri incelendiğinde meyvelerin kabuk ve sularında sırasıyla Washington 0,50-15,70 ve 0,12-1,52; yerli 1,61-13,00 ve 0,16-2,63; yafa 0,70-12,23 mg/L ve 0,12-1,55 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan da görüleceği gibi kabuk ve meyve suyundaki naringin düzeylerinin portakal çeşidine ve örnek alınan bölgeye göre farklılık göstermediği, ancak meyve kabuğundaki naringin düzeyinin meyve suyuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yapılan bazı literatür çalışmalarında portakal suyunda naringine rastlanılmadığının belirtilmesine rağmen [12,29] İtalya'nın güneyinde yetişen bazı portakal çeşitlerinin özellikle kabuklarında naringin tespit edildiği ve bunun da acılığa neden olduğu belirtilmiş ve bu örneklerdeki naringin, iklim ve meyve çeşidinin farklılığıyla açıklanmıştır [37].

Mandarin çeşitlerindeki naringin düzeyleri incelendiğinde; toplam 5 adet king çeşidinin meyve kabuğu ve suyunda naringin tespit edilememiş iken, hemen hemen bütün mineola çeşidinin kabuk ve meyve suyunda naringin düzeyleri sırasıyla 4,74-16,45 mg/L ve 0,13-0,85 mg/L aralığında gözlenmiştir.

Mandarinlerde naringinin varlığına ilişkin olarak Cemeroğlu ve Karadeniz [3]'in belirttiğine göre Maeda (1987) reçine kullanarak mandarin suyundaki naringinin %51'inin giderilebilmiştir. Bu çalışmada king örneklerinin hiçbirinde naringin gözlenememesine rağmen, bir başka mandarin çeşidi olan mineolada naringin tespit edilmesi mineolanın Dancy mandarini ve Duncan greyfurlunun bir melezi [2] olmasından kaynaklanabileceği ile açıklanabilir.

Bu çalışmada incelenen toplam 5 adet kütdiken limonlarında naringin tespit edilememiştir. Mouly ve ark. [12] çalışmalarında İspanya ve Fransa'dan alınan toplam 17 limon örneğinde naringin gözlemediklerini belirtmektedirler.

Turunç örneklerinde naringin düzeyleri incelediğinde; turunç kabuğunda 1399,62-1568,5 mg/L ve suyunda 124,52-325,3 mg/L naringin tespit edilmiştir. Couture ve Rouseff [38] tarafından yapılan çalışmada; 4 farklı turunç çeşidi olarak Seville, Bigaradier, Sour ve Bittersweet suyunda sırasıyla 70, 228, 223 ve 262 mg/L naringin tespit edilmiştir ve bu veriler tarafımızdan elde edilen veriler ile uyum içindedir. Ayrıca Mouly ve ark.[12] ve Hernandez ve ark.[16] gibi araştırmacılar tarafından da turunç örneklerinde naringinin saptandığı belirtilmektedir.

Çalışmada greyluft meyvesinin üç farklı çeşidinden alınan 8 örneğin kabuğunda naringin düzeyi 3192,70-7024,79 mg/L ve suyunda 308,30-510,07 mg/L olarak saptanmıştır.

Soares ve Hotchkiss [27] tarafından yapılan çalışmada greyluft sularındaki naringin düzeyleri 460-700mg/L aralığında; Tsen [33] tarafından yapılan çalışmada 170-250 mg/L aralığında ve Jimeno ve ark. [14] tarafından yapılan çalışmada ise 300 mg/L naringin saptandığı belirtilmektedir. Tarafımızdan incelenen greyluft örneklerinin meyve sularında naringin düzeylerinin diğer çalışmalardaki sonuçlardan farklı olması çeşitlerin aynı olmamasıyla açıklanabilir.

Çizelge 4.2. Ticari Olarak Bazı Greyfurt Meyve Suyundan Üretilen Konsantrelerin Naringin Düzeyleri (mg/L)

Örnek Türü	Örnek No	Naringin Düzeyi**
Greyfurt konsantresi	1	512,34
	2	525,05
	3	534,31
	4	408,47
	5	543,39

** 11,8 brikste ölçüm yapılmıştır.

Akdeniz Bölgesi' nde çeşitli alanlarda yetişen turunçgil meyvelerinden ticari olarak üretilen farklı partideki greyluft ve portakal konsantrelerin naringin düzeyleri

Çizelge 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. Çizelge 4.2.’den de görüleceği gibi; greyfurt suyundan elde edilen konsantrelerin 11,8 brikste naringin düzeyleri, 408,47 ile 543,39 mg/L arasında değişmektedir. Çizelge 4.2’den de görüleceği üzere portakal kabuğundan (cloudy) ve suyundan elde edilen konsantrelerin 50 brikteki naringin düzeyleri ise sırasıyla 95-955 mg/L ve 0,61-19,40 mg/L olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.3. Ticari Olarak Üretilen Portakal Meyve Suyu ve Kabuk Konsantrelerinin Farklı Partilerdeki Naringin Düzeyleri* (mg/L)

Portakal Konsantresi							
Parti No	Portakal Suyu	Parti No	Portakal Suyu	Parti No	Portakal Cloudy	Parti No	Portakal Cloudy
1	3,62	16	14,23	1	145	16	427
2	14,93	17	5,82	2	316	17	295
3	6,77	18	-	3	263	18	224
4	8,93	19	9,48	4	449	19	315
5	9,64	20	5,61	5	573	20	403
6	8,62	21	8,39	6	153	21	298
7	-	22	2,11	7	418	22	234
8	1,38	23	0,61	8	558	23	237
9	16,04	24	4,50	9	468	24	490
10	-	25	6,92	10	342	25	333
11	10,17	26	1,27	11	440	26	320
12	13,33	27	3,10	12	414	27	401
13	5,48	28	9,90	13	406	28	506
14	19,4	29	1,96	14	287	29	95
15	4,15	30	2,89	15	319	30	955
Ortalama		7,34		Ortalama		369,5	
Max		19,4		Max		955	
Min		0,61		Min		95	
Stdev		4,98		Stdev		161,5	

*Naringin tayini konsantrelerin son ürün briks değeri olan 50 brikte yapılmıştır.

Portakal suyu konsantresi 11,8 brikse seyreltiildiğinde naringin düzeyinin tespiti zorlaşmaktadır. Ancak görüldüğü gibi portakal cloudy ve greylift konsantrelerinde naringin düzeyi oldukça yüksek ve partilere göre farklılıklar göstermektedir. Konsantrelerin naringin düzeyinin partilere göre farklılıklar göstermesi, meyvelerdeki naringin düzeylerinin homojen bir dağılımda olmamasından ve konsantre üretimi sırasında uygulanan özellikle ekstraksiyon işleminden kaynaklanabilmektedir.

4.2. NARINGİNİN NARINGİNAZ ENZİMİ İLE GİDERİLMESİNDE OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

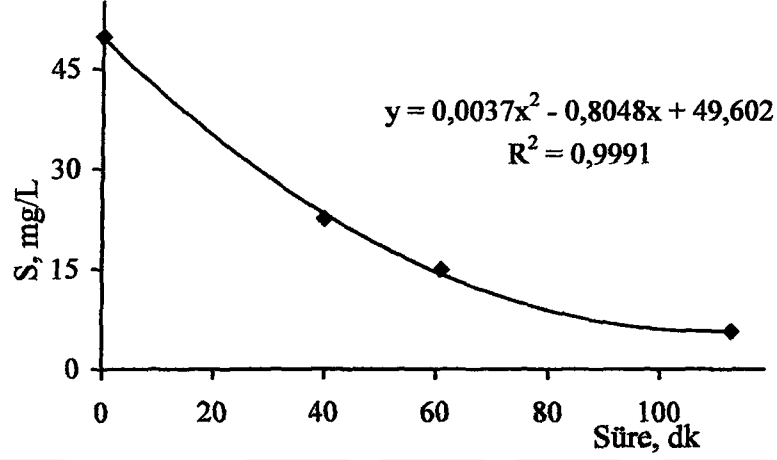
Enzim aktivitesinin belirlenmesinde Bölüm 2.4.2' deki yol izlenmiştir. Tepkime hız sabitleri, yalancı-birinci mertebeden tepkime varsayılarak hesaplanmıştır. Farklı derişimlerdeki her substrat çözeltisi için naringin giderimi ısıt işlem süresine karşı, Şekil 4.3' deki benzer şekilde çizilmiştir. Naringin gideriminin zamana bağımlılığını hesaplamak için polinomial bir regresyon gerçekleştirilmiştir. Başlangıç tepkime hızı (V_0), derişime karşı zaman eğrisinin sıfırncı zamandaki eğiminden hesaplanmıştır [39].

Naringinin, naringinaz enzimi ile giderilmesinde; naringinaz aktivitesine etki eden sıcaklık, pH, enzim ve substrat derişimi ve süre gibi parametrelerin etkisi aşağıda özetlenmiştir.

4.2.1. Naringinaz ve Naringin Derişimine Bağılı Olarak Başlangıç Tepkime Hızlarının Belirlenmesi

Sabit sıcaklık (40°C) ve sabit pH (4.0) koşullarında, farklı derişimlerdeki naringinaz enzimi üzerine naringinin zamanla etkisi incelenmiş ve sonuçları Çizelge 4.4' de verilmiştir. Çizelge 4.4' deki değerler kullanılarak; tepkime çözeltisindeki naringinin naringinazla gideriminin süreye göre değişim grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden elde edilen eğrilerin sıfırncı andaki eğimlerinden her bir naringinaz derişimi için başlangıç tepkime hızı hesaplanmıştır. Örneğin, başlangıç

derişimleri 50 mg/L naringin ve 100 mg/L naringinaz olan tepkime çözeltilisindeki naringin miktarının süreye göre değişimi Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.3. 50 mg/L Naringin ve 100 mg/L Naringinaz Çözeltilisinde Naringin Miktarının Süreye Göre Değişimi

Şekil 4.3' den eşitlik 4-1 gibi bir eğri eşitliği elde edilmiştir. Burada Y, naringin derişimini (S); x ise süreyi (t) göstermektedir (4-2).

$$Y = 0,0037x^2 - 0,8048x + 49,602 \quad (4-1)$$

$$S = 0,0037t^2 - 0,8048t + 49,602 \quad (4-2)$$

Eşitlik 4-2 için t=0 anında 1.dereceden türev alındığında başlangıç tepkime hızını elde edilmektedir.

$$V_0 = \frac{dS}{dt} = 0,0037 \times 2t - 0,8048 \quad (4-3)$$

$$\left. \frac{dS}{dt} \right|_{t=0} = 0,0037 \times 2t - 0,8048 \quad (4-4)$$

$V_0 = 0,8048$ mg/L.dk olduğu görülmektedir.

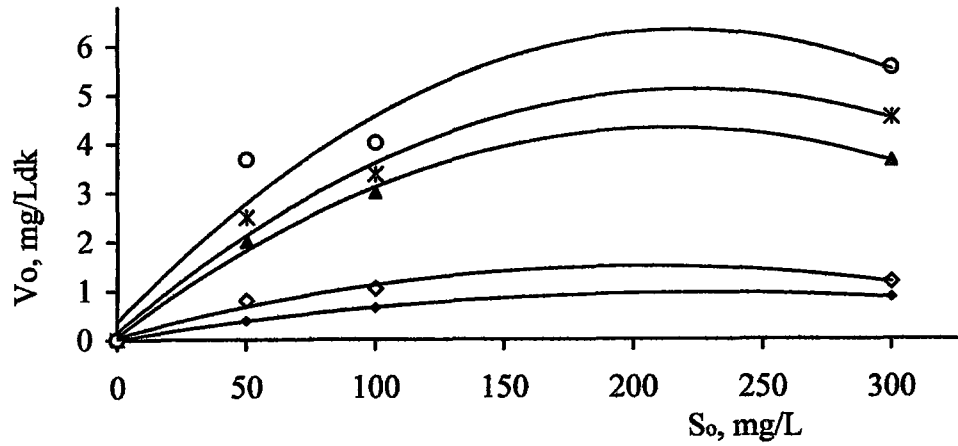
Çizelge 4.4. Farklı Derişimlerde Naringinaz ve Naringin İçeren Çözeltilerde Naringin Miktarının Süreye Göre Değişimi (mg/L)

E_0	S_0	Süre, dk	Ortamda kalan S	E_0	S_0	Süre, dk	Ortamda kalan S		
50	50	0	48,0	100	200	0	201,6		
		8	39,6			60	126,4		
		18	35,4			180	49,1		
	100	100	41		27,8	200	50	0	299,7
			50		23,6			104	187,9
			70		22,0			190	110,9
			0		101,0			0	49,5
			20		85,7			15	22,2
			40		74,6			30	14,1
			84		54,4			30	14,1
200	200	155	32,1	300	100	0	100,5		
		0	201,6			20	60,4		
		76	156,8			50	25,9		
		190	94,3			80	11,7		
		0	311,9			0	201,9		
		45	261,7			53	88,1		
		103	214,4			136	23,6		
300	300	0	311,9	300	50	0	311,9		
		45	261,7			69	118,4		
		103	214,4			170	41,6		
		0	49,8			0	49,5		
		40	22,6			6	31,8		
		61	14,9			20	14,7		
		113	5,7			66	1,2		
100	100	0	95,6	100	100	0	101,2		
		22	74,7						
		55	46,1						
		96	24,6						

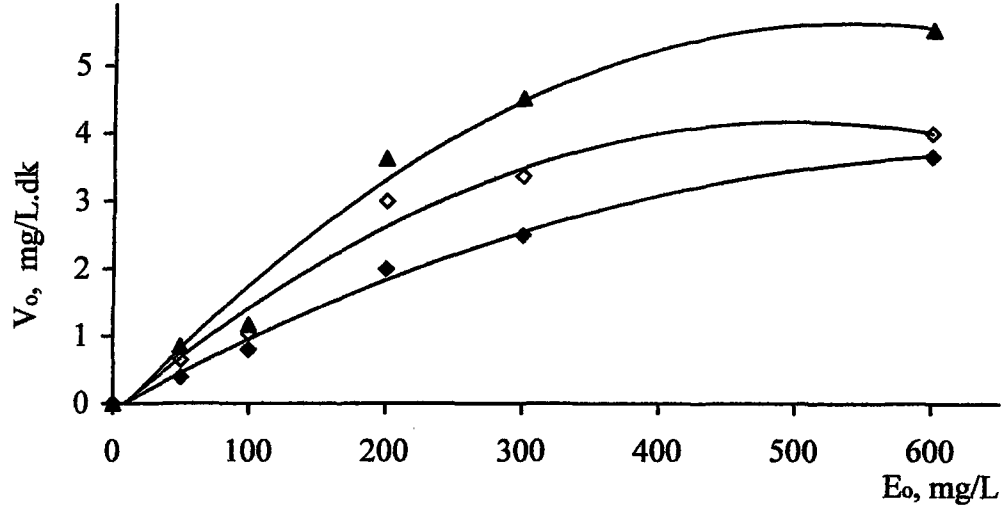
Çizelge 4.4 (devam)

E_0	S_0	Süre, dk	Ortamda kalan S	E_0	S_0	Süre, dk	Ortamda kalan S		
300	100	27	32,9	600	100	0	99,2		
		48	13,6			20	19,0		
	200	0	201,9		200	0	201,9		
			72				38,4	50	24,5
			115				13,8	71	9,3
	300	0	311,9		300	0	311,9		
			56				92,6	10	304,4
			115				31,3	27	250,4
								70	120,5
	600	50	0		49,5			166	32,5
			7		27,5			70	120,5
			28		6,5			166	32,5

Naringinaz ve naringin derişimlerinin değiştiği her bir tepkime çözeltilisine ait başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır (Ek 1). Bu hız değerleri kullanılarak naringin ve naringinaz derişimlerine karşılık başlangıç tepkime hız grafikleri çizilmiştir (şekil 4.4 ve 4.5).



şekil 4.4. Naringin Derişimine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızı (\blacklozenge : $[E_0]=50$; \circ : $[E_0]=100$; \blacktriangle : $[E_0]=200$; $*$: $[E_0]=300$; \circ : $[E_0]=600$ mg/L)



Şekil 4.5. Naringinaz Derişimine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızı (◆:[S₀]=50 ; ◇:[S₀]=100 ; ▲:[S₀]=300 mg/L)

Farklı derişimlerde naringinaz ve naringin içeren çözeltilerde başlangıç tepkime hızlarının değişimi incelendiğinde enzim ve substrat derişimlerinin artışıyla tepkime hızı da artmaktadır (Şekil 4.4 ve 4.5). Ancak Şekil 4.4 ve 4.5' den de görüleceği gibi optimum başlangıç tepkime hızları, 300 mg/L naringinaz ve 200 mg/L naringin derişimlerinde elde edilebilmektedir.

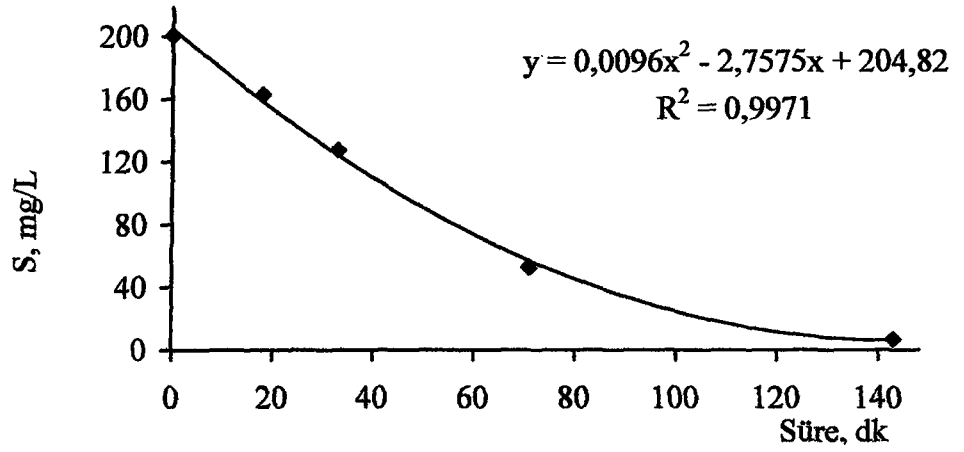
4.2.2. Naringinazın Başlangıç Tepkime Hızlarına pH ve Sıcaklığın Etkisi

Sabit derişimdeki naringin (200 mg/L) ve naringinaz (300 mg/L) içeren tepkime çözeltilerinin farklı sıcaklık ve pH larda naringin miktarının süreye göre değişimi Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5'deki değerler kullanılarak; farklı pH ve sıcaklıklarda, 300 mg/L naringinaz ve 200 mg/L naringin içeren tepkime çözeltilerdeki naringin miktarının süreye göre değişim grafikleri çizilmiştir ve bu grafiklerden elde edilen doğru denklemlerinin eğimlerinden her bir pH veya sıcaklık için başlangıç tepkime hızı hesaplanmıştır (Ek 2). Örneğin, pH 4.0 ve 50°C deki başlangıç derişimleri 200 mg/L naringin ve 300 mg/L naringinaz olan tepkime çözeltilesindeki naringin miktarının süreye göre değişimi Şekil 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sabit Derişimde Naringin (200 Mg/L) ve Naringinaz (300 Mg/L) İçeren Tepkime Çözeltilerinin Farklı Sıcaklık ve pH larda Naringin Miktarının Süreyle Değişimi

Sıcaklık, °C	pH	Süre, dk	S, mg/L	Sıcaklık, °C	pH	Süre, dk	S, mg/L	
40	3,5	0	200,4	50	4,0	0	200,4	
		22	155,6			18	163,0	
		38	140,7			33	127,5	
		93	112,8			71	52,8	
		164	33,9			143	6,9	
	4,0	0	201,9		60	3,5	0	200,4
		72	38,4				21	171,0
		115	13,8				79	163,1
		10	182,9				0	200,4
		53	95,4				62	26,3
50	3,5	152	18,2	60	4,0	117	5,5	
		0	200,4			0	200,4	
		18	120,8			28	49,1	
		59	93,5			49	26,8	
		65	40,2			86	3,2	
	4,5	0	200,4		80	4,5	0	200,4
		76	23,5				21	61,4
		131	5,8				36	36,4
							80	2,6



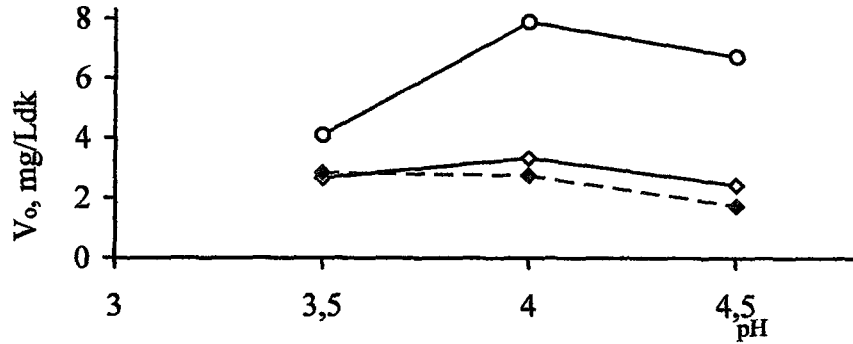
Şekil 4.6. Naringin Derişiminin Süreyle Değişimi ($S_0 = 200$ mg/L, $E_0 = 300$ mg/L, pH 4,0 ve 50°C)

Şekil 4.6' dan eşitlik 4-5 elde edilmiştir. Bu eşitlik Bölüm 4.2.1'de olduğu gibi kullanılarak başlangıç tepkime hızı $2,76$ mg/L.dk olarak hesaplanmıştır.

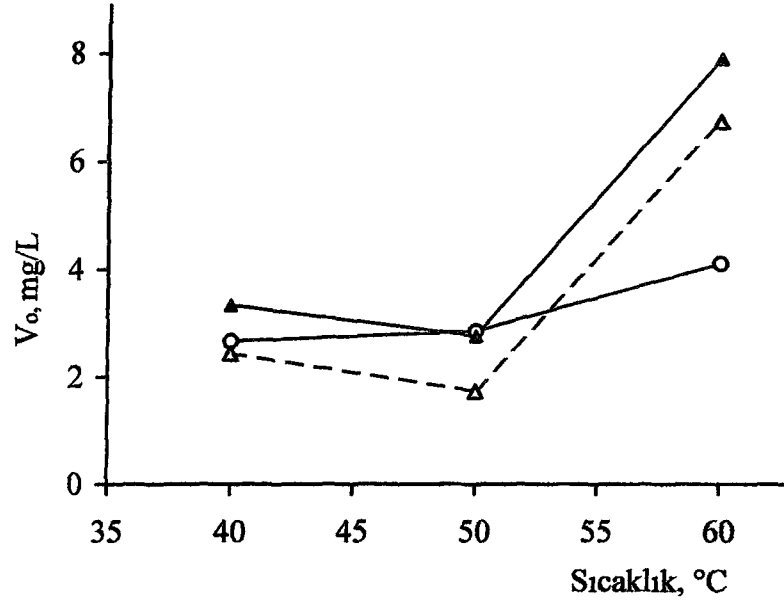
$$S = 0,0096 t^2 - 2,7575 t + 204,82 \quad (4-5)$$

Şekil 4.6 için yapılan işlemler, kullanılan tüm sıcaklık ve pH değerleri için tekrarlanarak başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır (Ek 2).

Farklı sıcaklık ve pH değerlerine karşılık başlangıç tepkime hız grafikleri Şekil 4.7 ve 4.8' de görülmektedir.



Şekil 4.7. Farklı pH Değerlerine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları (\diamond : 40°C ; \blacklozenge : 50°C ; \circ : 60°C)

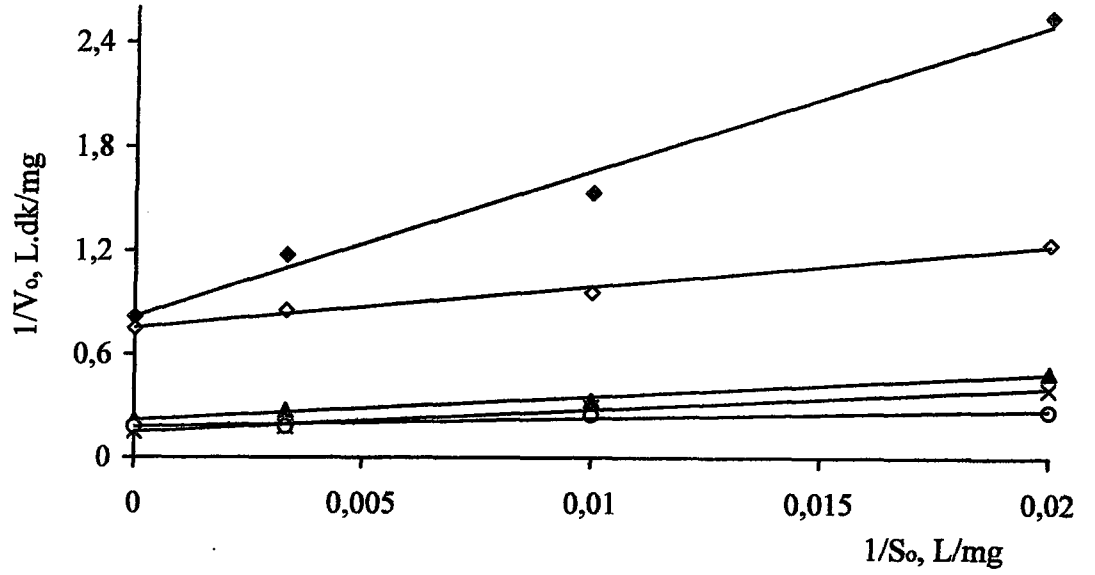


Şekil 4.8. Farklı Sıcaklık Değerlerine Karşılık Başlangıç Tepkime Hızları (O pH 3,5; ▲pH 4,0; Δ pH 4,5)

Farklı sıcaklık ve pH larda sabit derişimde naringinaz ve naringin içeren çözeltilerde süreye göre naringin miktarının değişimi incelendiğinde; Şekil 4-7 ve 4.8' den de görüleceği gibi; maksimum başlangıç tepkime hızı, pH 4.0 ve 60°C sıcaklıkta elde edilebilmektedir.

4.2.3. Naringinaz' ın K_m Değerinin Hesaplanması

Maksimum hız (V_m) ve buna bağlı olarak Michaelis-Menten sabiti olarak bilinen K_m değerlerini belirlemek için bölüm 2.4.2' de belirtildiği gibi Lineweaver-Burk hız eşitliğini elde etmek amacıyla $1/S_0$ ve $1/V_0$ grafiği çizilmiştir (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Lineweaver-Burk Hız Grafiği (◆; 1/E50; ◇: 1/E100; ▲: 1/E200; *:1/E300 ; O: 1/E600)

Lineweaver-Burk hız grafiğinde; doğrunun dikey eksenini ($1/V_0$ eksenini) kestiği nokta $1/V_m$, yatay eksenini ($1/S_0$ eksenini) kestiği nokta ise $-1/K_m$ i vermektedir [36]. Şekil 4.9' dan elde edilen Lineweaver-Burk eşitlikleri (2-17) kullanılarak her bir enzim derişimi için hesaplanan V_m , K_m ve R^2 değerleri Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı Naringinaz Derişimlerinde Lineweaver-Burk Grafiğinden Hesaplanan V_m , K_m ve R^2 Değerleri.

E_0 , mg/L	V_m , mg/L.dk	K_m , mM (mg/L)	R^2
50	1,22	0,179 (103,68)	0,98
100	1,33	0,055 (31,99)	0,98
200	4,61	0,109 (63,21)	0,98
300	5,34	0,098 (57,13)	0,99
600	5,69	0,052 (29,98)	0,85

Bir enzimin K_m değeri onun substratına olan ilgisini göstermektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçük olmaktadır [34-36].

Çizelge 4.6' dan da görüleceği gibi, K_m değerleri 0.052–0,179 mM arasında değişmektedir.

Bölüm 4.2.1 ve 4.2.2' de elde edilen verilerden de görüleceği gibi maksimum başlangıç tepkime hızları;

Naringin derişimi	: 200 mg/L (0,344 mM)
Naringinaz derişimi	: 300 mg/L
pH	: 4,0
Sıcaklık	: 60°C

koşullarında elde edilebilmiştir. Dolayısıyla bu değerler, bu çalışma için optimum koşullar olarak tanımlanmıştır. Bu durumda, naringinazın optimum koşuldaki K_m değerinin 0,098 mM olduğu görülmektedir. Hesaplanan bu K_m değeri ile literatürdeki K_m değerleri ile Çizelge 4.7'de karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada hesaplanan K_m değerlerinin, diğer çalışmalardan düşük olması, belirlenen bu optimum koşulda naringinazın naringine olan ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. Optimum Koşullarda Elde Edilen K_m Değerlerinin, Literatürdeki Optimum Koşullar ve K_m Değerleri ile Karşılaştırılması

PH	T,°C	Naringin	K_m	Kaynak
4,5	40	%0,02	0,87 mM	Tsen, 1984
3,7	25	400 mg/L	-	Tsen and Yu, 1991
3,7	23	0,4-2,7 mM	3,6 mM	Soares ve Hotkiss
3,7	55	%0,08	1,56 mM	Tsen ve ark, 1989
3,5	57	-	7,0 mM	Jimeno ve ark., 1987
3,7	55	%0,08	1,56 mM	Tsen ve Tsai, 1988
4,0	60	200 mg/L	0,098 mM	Bu çalışma

4.3. PORTAKAL VE GREYFURT MEYVE SULARINDA NARINGİN MİKTARININ AZALTILMASI

Ticari olarak üretilen bazı portakal ve greyfurt konsantrelerinin içerdiği naringinin optimum koşullarda naringinaz ile giderimi Çizelge 4.8’de görülmektedir.

Çizelge 4.8’den de görüleceği gibi; portakal kabuk konsantresine 300 mg/L naringinaz eklendiğinde 60°C’ deki en yüksek naringin giderimi 41. dakikada % 38,5 olarak görülmektedir. Greyfurt suyundan elde edilen konsantrelere ise 300 mg/L naringinaz eklendiğinde 60°C deki en yüksek naringin gideriminin, başlangıç naringin derişimi 357 mg/L olan örneğin 72. dakikasında %36 olarak görülmektedir. Başlangıç naringin derişimi yüksek olan (>50mg/L) greyfurt konsantrelerinde naringin giderimi yaklaşık % 30 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Bazı Portakal ve Greyfurt Konsantrelerinin İçerdiği Naringinin Optimum Koşullarda Naringinaz ile Giderimi

Örnek No*	Örnek Özelliği		Süre, dk	Naringin, mg/L	% Giderim	
	Briks	pH				
PCI 1	10.parti	11,8	4,03	0	191,228	0,0
				8	184,321	3,6
				23	166,818	12,8
				45	151,415	20,8
PCI 2	9.parti	11,8	4,13	0	167,744	0,0
				7	164,872	1,7
				35	130,317	22,3
				85	108,607	35,3
PCI 4	3.parti	11,2	4,00	0	23,183	0,0
				19	15,247	34,2
				32	14,986	35,4
				41	14,293	38,5

Çizelge 4.8. (Devam)

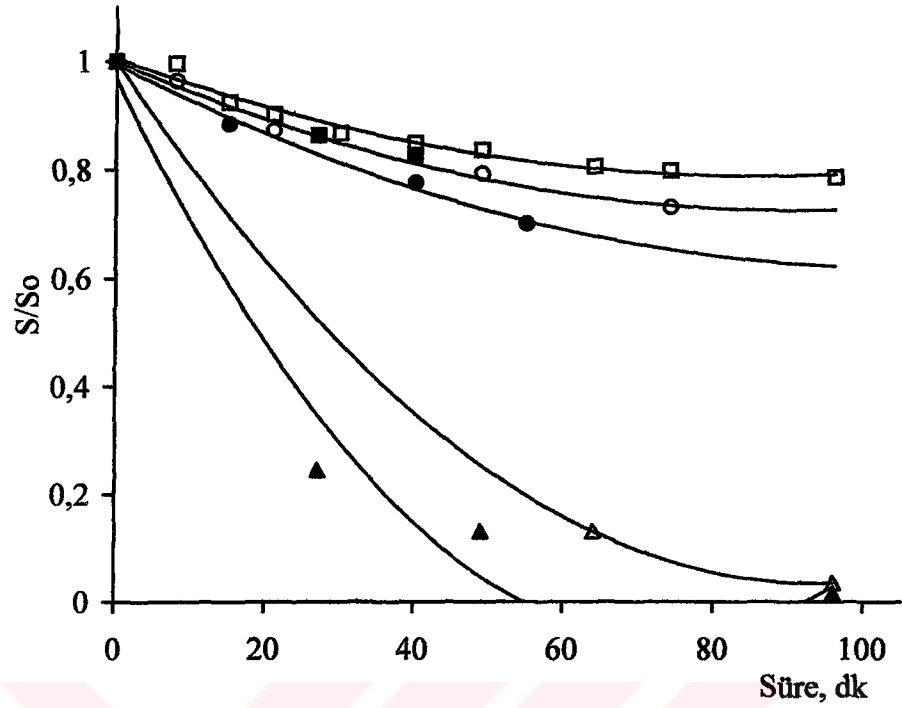
Örnek No*	Örnek Özelliği	Özellikler		Süre, dk	Naringin, mg/L	% Giderim
		Briks	pH			
GK1	6.parti	11,2	2,90	0	498,349	0,0
				12	447,471	10,2
				23	416,015	16,5
				62	381,412	23,5
GK2	6.parti	11,8	2,88	0	515,647	0,0
				8	513,372	0,4
				15	476,747	7,5
				21	465,056	9,8
				30	446,667	13,4
				40	437,113	15,2
				49	430,612	16,5
				64	414,831	19,6
GK3	6.parti	24,8	2,89	0	1110,694	0,0
				10	1031,936	7,1
				35	843,751	24,0
				46	816,942	26,4
				64	792,003	28,7
				74	792,003	28,7
GK4	7 parti	11,2	2,91	0	485,995	0,0
				28	391,502	19,4
				43	375,267	22,8
				76	333,128	31,5
GK6		8,60	2,97	0	357,189	0,0
				26	275,241	22,9
				51	263,815	26,1
				72	228,408	36,1

** PCI, portakal kabuk konsantresi (cloudy); GK, greyfurt suyu konsantresini göstermektedir.

Doğal portakal ve greyfurt suyunun farklı oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanan karışımların naringin düzeyi ve naringinin naringinaz ile giderimi incelendiğinde; karışımda greyfurt oranı arttıkça başlangıç naringin derişiminin arttığı ve naringin gideriminin zamanla azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Doğal Portakal ve Greyfurt Suyundan Farklı Oranlarda Hazırlanan Karışımın İçerdiği Naringinin, Optimum Koşullarda Naringinaz ile Giderimi

Örnek Özelliği	°Briks	pH	Süre dk	Naringin mg/L	% Giderim
Greyfurt suyu	9,01	3,29	0	322,247	0,0
			11	296,011	8,1
			26	269,868	16,3
			36	251,088	22,1
			53	231,194	28,3
Portakal-greyfurt suyu (1:3)	10,12	3,42	0	231,012	0,0
			16	204,358	11,5
			39	179,034	22,5
			55	161,696	30,0
Portakal-greyfurt suyu (1:1)	10,61	3,52	0	189,711	0,0
			8	182,607	3,7
			37	155,663	17,9
			49	149,326	21,3
Portakal-greyfurt suyu (3:1)	12,27	3,71	0	68,768	0,0
			27	59,337	13,7
			37	56,792	17,4
Portakal-greyfurt suyu (19:1)	13,17	3,82	0	14,017	0,0
			13	12,577	10,3
			24	11,639	17,0
Portakal suyu	13,39	3,88	0	-	-



Şekil 4.10. Naringinin Naringinaz Enzimi ile 60°C'de Hidrolizi (□:greyfurt suyu konsantresi, 11,8 briks ve 2,88 pH; △: Portakal -greyfurt (3:1) karışımı, 12,27 Briks ve 3,71 pH; ○: Portakal cloudy, 11,8 Briks ve 4,03 pH; ●: Portakal-greyfurt (1:3) karışımı, 10,12 Briks ve 3,42 pH; ▲: sulu tepkime çözeltisi, 3,5 pH ; ▲: sulu tepkime çözeltisi, 4,0 pH)

Şekil 4.10' da greyfurt suyu konsantresi, portakal cloudy, greyfurt ve portakal suyu karışımları ve sulu tepkime çözeltilerinde, naringinin naringinaz ile 60°C'de hidrolizi görülmektedir. Başlangıç derişimi 200 mg/L naringin olan pH 4,0 ve 3,5 sulu tepkime çözeltilerinde naringin giderimi karşılaştırıldığında optimum pH olarak belirlenen pH 4,0'da naringin gideriminin daha yüksek olduğu görülmektedir. Greyfurt suyu konsantresi, portakal cloudy, greyfurt ve portakal suyu (1:3) ve (3:1) karışımlarının başlangıç naringin derişimleri sırasıyla 515,65, 191,228, 68,77 ve 231,01 mg/L olarak ölçülmüştür. Tepkimenin yaklaşık 45 dakika sonunda bu örneklerin naringin düzeylerinin başlangıç naringin derişimlerine oranları sırasıyla 0,85, 0,79, 0,80 ve 0,77 olarak saptanmıştır. Şekil 4.10'dan portakal ve greyfurt örneklerinde naringin gideriminin sulu tepkime çözeltilerinden çok daha az olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda greyfurt suyunun doğal olarak yapısında bulunan sitrik asit, fruktoz, glikoz ve naringinin hidrolizi sonucu oluşan ramnoz, naringinaz için inhibitör etki gösterdiği belirtilmektedir [13,24,31]. Portakal ve greyfurt örneklerinin S/S_0 değerlerinin yaklaşık aynı sürelerdeki sulu tepkime çözeltilerinden çok yüksek olması; bu meyvelerin içerdiği farklı tür ve miktardaki asit, şeker ve diğer bileşenlerin naringinaz aktivitesini etkileyebileceği ile açıklanabilir. Ayrıca portakal ve greyfurt meyvelerinin başlangıç naringin derişimleri ve diğer içeriklerinin aynı olmaması naringin gideriminin farklı oranlarda olmasına neden olmaktadır.



5. SONUÇLAR

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Akdeniz Bölgesi' nde yetişen bazı portakal çeşitlerinin;

- Meyve kabuk ve suyunda naringin saptandığı (sırasıyla 0,50-15,70 mg/L ve 0,12-2,63 mg/L),
- Naringin düzeylerinin çeşit ve bölgeler arasındaki farkın t-testine göre %95 oranında önemsiz olduğu,
- Belirlenen naringin düzeylerinin içilebilirlik sınırı olan 50 mg/L' nin altında olduğu,
- Bu bölgedeki portakalların kabuk konsantrelerinde de naringin saptandığı (95-573 mg/L) ve meyve suyu konsantresinde belirlenen naringin düzeyleri içilebilirlik sınırının altında iken, kabuk konsantrelerinin naringin düzeylerinin içilebilirlik sınırının üstünde olduğu,
- Teknolojik olarak üretilmiş olan kabuk konsantrelerinin (cloudy) naringin düzeyi partilere göre belirgin farklılıklar göstermektedir. Portakal kabuk konsantrelerinin yüksek naringin düzeyi, meyvenin doğal kabuğundan kaynaklanabileceği gibi, özellikle portakal meyvesinden fiziksel olarak ayırt edilmesi güç olan turunç ve greyfurt meyvelerinden de kaynaklanabileceği belirlenmiştir.

Akdeniz Bölgesi' nde yetişen turunç ve greyfurt çeşitlerinin meyve kabuk ve sularında yüksek düzeyde naringin saptandığı;

- Turunç meyve kabuğunda 1399,62-1568,5 mg/L ve meyve suyunda 124,52-325,3 mg/L; greyfurtun meyve kabuğunda 3192,70-7024,79 mg/L ve meyve suyunda 308,30-510,07 mg/L naringin olduğu,
- Naringin düzeylerinin çeşitlere göre farklılıklar göstermediği ve belirlenen naringin düzeylerinin içilebilirlik sınırı olan 50 mg/L'nin oldukça üstünde olduğu saptanmıştır.

Teknolojik olarak üretilen portakal kabuğu konsantresindeki yüksek naringin düzeyinin giderilmesi veya daha düşük düzeye indirilmesi için naringinaz kullanımının uygunluğu incelenmiş olup, optimum koşullar

Naringin derişimi	: 200 mg/L
Naringinaz derişimi	: 300 mg/L
PH	: 4,0
Sıcaklık	: 60° C

olarak belirlenmiştir.

➤ Ayrıca bu koşullarda naringinazın K_m değeri 0,049–0,179 mM arasında saptanmıştır.

Optimum koşullarda; naringin gideriminin süreye göre artış gösterdiği ve naringin çözeltisinde 86 dakikada % 98,4 olarak belirlenmiştir.

➤ Ancak, benzer koşullarda doğal greyfurt suyu, konsantresi ve portakal kabuğu konsantresi örneklerindeki naringin gideriminin yaklaşık olarak % 30–40 oranında gerçekleştiği saptanmıştır.

➤ Bu örneklerdeki %naringin gideriminin sulu reaksiyon çözeltisindeki giderimden düşük olması; doğal portakal kabuk ve greyfurt suyu konsantrelerinin pH, şeker, asit vb. meyvenin içeriği ile özellikle greyfurt örneklerinde başlangıç derişimlerinin yüksek olması ve naringinaz aktivitesini etkileyen başka bileşenlerin bulunmalarından kaynaklanabileceği saptanmıştır.

Sonuç olarak; Akdeniz Bölgesi'nde yetişen turunçgil meyvelerinden elde edilen ürünlerindeki naringinin meyveden kaynaklandığı ve bu ürünlerde taşış olmadığı tespit edilmiştir. Uygulanan bu enzimatik yöntemle, bu bölgede yetişen turunçgil meyvelerinin özellikle kabuk konsantrelerindeki naringinin istenen düzeylere getirilebileceği ve acılık gideriminde uygulanabilirliği yüksek, ekonomik ve ürünlerin diğer özelliklerini etkilememesi gibi büyük avantajlar sağlanabilecektir. Ayrıca bu yöntem yüksek düzeyde naringin içeren greyfurt ürünlerinin acılığının giderilmesi için de kullanmaya elverişlidir.

KAYNAKLAR

- [1] Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. "Beverages Technology, Chemistry and Microbiology", Chapman & Hall, USA, 464 s.,(1994)
- [2] Akdeniz İhracatçı Birlikleri. Turunçgil Dünyası, 120 s, Mersin, (2000)
- [3] Cemeroğlu, B. ve Karadeniz, F. "Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 2-Meyve Suyu Üretim Teknolojisi", Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No. 25, Ankara, 384 s., (2001)
- [4] Rauseff, R., Gmitter, F. and Grosser, J. "Understanding Natural Flavors", J.R. Piggot , and A. Paterson (ed), Citrus Breeding and Flavour, 1^s ed, Chapman & Hall, USA, 318 s., (1994)
- [5] Acar, J.(ed), "Meyve ve Sebze Suları Teknoloji, Kimya, mikrobiyoloji, Analitik, Tanım ve Yasalar", Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 602 s., (1988)
- [6] Kimball, D.A. "Citrus Processing A Complete Guide", Aspen Publishers, Inc., Maryland, 450 s., (1999)
- [7] Braddock, R.J. "Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology", John Wiley & Sons, Inc., New York, 247 s., (1999)
- [8] Altan, A. "Çukurova Bölgesi'nde Yetiştirilen Portakal Çeşitlerinin Meyve Suyuna İşlenme Durumları",Çukurova I. Tarım Kongresi, s.302-305, (1991)
- [9] Braddock, R.J. and Cadwallader, K.R. "Citrus By-Products Manufacture for Food Use", Food Technology, 2:105-110, (1992)
- [10] Altan, A. "Çukurova Bölgesinde Yetiştirilen Beş Portakal Çeşidinin Meyve Suyu Teknolojisi Bakımından Önemli Bazı Özellikleri", Gıda, 20(4): 215-225, (1995)
- [11] Buğa, G., Hayaloğlu, İ.A. ve Altan, A. "Portakalların Derim Sonrasında Şiddetli Don Koşullarına Maruz Kalmasının Limonin İçeriği ve Diğer Bazı Özellikler Üzerindeki Etkileri", Gıda Teknolojisi, 1(8): 34-38, (1996)
- [12] Mouly, P.P., Arzouyan, C.R., Gaydou, E.M. and Estienne, J.M. "Differentiation of Citrus Juices by Factorial Discriminant Analysis Using Liquid Chromatography of Flavanone Glycosides", J. Agric. Food Chem. 42: 70-79, (1994)

- [13] Cemeroglu, B., Yemanicioğlu, A. ve Özkan, M. "Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1-Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları", Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No.24, Ankara, 328 s., (2001)
- [14] Jimeno, A., Manjon, A., Canovas, M. and Iborra, J.L. "Use of Naringinase Immobilized on Glycochase-coated Porous Glass for Fruit Juice Debittering", *Process Biochemistry*, **2**: 13-16, (1987)
- [15] Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Hiroshi, T. and Okada, S. "Synthesis of Neohesperidin Glycosides and Naringin Glycosides by Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkalophilic *Bacillus* Species", *J.Food Sci.*, **60(4)**: 645-649, (1996)
- [16] Hernandez, E., Couture, R., Rouseff, R., Chen, C.S. and Barros, S. "Evaluation of Ultrafiltration and Adsorption to Debitter Grapefruit Juice and Grapefruit Pulp Wash", *J. Food Sci.*, **57**: 664-670, (1992)
- [17] Chien, P.J., Sheu, F. and Shyu, Y.T. "Monitoring Enzymatic Debittering in Grapefruit Juice by High Performance Liquid Chromatography", *J. Food ve Drug Analysis*, **9(2)**: 115-120, (2001)
- [18] Altan, A. "Turunçgil Sularında Acılık Ögesi Olarak Naringin", *Gıda*, **8**: 19-32, (1983)
- [19] Fellers, P.J. "A Review of Limonin in Grapefruit (*Citrus paradisi*) Juice, Its Relationship to Flavour, and Efforts to Reduce It", *J. Sci. Food Agric.*, **49**: 389-404, (1989)
- [20] Bronner W.E. and Beecher G.R. "Extraction and Measurement of Prominent Flavonoids in Orange and Grapefruit Juice Concentrates", *J. Chromatogr. A.*, **705**: 247-256, (1995)
- [21] Coffin, D.E. "A Method for Isolation and Identification of The Flavanone Glycosides of Citrus Fruit Juices", *J. Agr. Food Chem.*, **19(3)**: 513-516, (1971)
- [22] Ross, S.A., Ziska, D.S., Zhao, K., and ElSohly, M.A. "Variance of Common Flavonoids by Brand of Grapefruit Juice. *Fitoterapia*", **71**: 154-161, (2000)
- [23] Castillo, J., Obdulio, B. and Rio, J.A. "Naringin and Neohesperidin Levels During Development of Leaves, Flower Buds, and Fruits of *Citrus aurantium*", *Plant Physiol*, **99**: 67-73, (1991)

- [24] Pupin, A.M, Dennis, M.J. and Toledo, M.C.F. "Flavanone Glycosides in Brazilian Orange Juice", *Food Chemistry*, **61(3)**: 275-280, (1998)
- [25] Swatsitang, P., Greg T., Robarts, K. and Jardine, D. "Isolation and Identification of Phenolic Compounds in *Citrus sinensis*", *Analytica Chimica Acta.*, **417**: 231-240, (2000)
- [26] Tsen, H.Y. and Tsai, S.Y. "Comparison of The Kinetics and Factors Affecting The Stability of Chitin Immobilized Naringinase from Two Fungal Source", *J. Ferment. Technol.*, **66**: 193-198, (1988)
- [27] Soares,N.F.F. and Hotchkiss, J.H. "Naringinase Immobilization to Packaging Films for Reducing Naringin Concentration in Grapefruit Juice", *J. Food Sci.*, **63**: 61-65, (1998)
- [28] Tsen, H.Y., Tsai, S.Y. and Yu, G.K. "Fiber Entrapment of Naringinase from *Penicillium sp.* and Application to Fruit Juice Debittering", *J. Ferment. and Bioeng.*, **67**: 186-189, (1989)
- [29] Mouly, P., Gaydou, E.M. and Auffray, A. "Simultaneous Separation of Flavanone Glycosides and Polymethoxylated Flavones in Citrus Juices Using Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, **800**: 171-179, (1998)
- [30] Puri, M., Marwaha, S.S., Kothary, R.M. and Kennedy, J.F. "Biochemical Basis of Bitterness in Citrus Fruit Juices and Biotechnological Approches for Debittering", *Critical Reviews in Biotechnology*, **16**: 145-155, (1996)
- [31] Tsen, H.Y. and Yu, G.K. "Limonin and Naringin Removal from Grapefruit Juice with Naringinase Entrapped in Cellulose Triacetate Fibers", *J. Food Sci.*, **56**: 31-34, (1991)
- [32] Bhat, M.K. "Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology", *Biotechnology Advances*, **18**: 355-383, (2000)
- [33] Tsen, H.Y. "Factors Affecting the Inactivation of Naringinase Immobilized on Chitin During Debittering of Fruit Juice", *J. Ferment. Tech.*, **62(3)**: 263-267, (1984)
- [34] Segel, I. H. "Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems", John Wiley & Sons, Inc., New York, 957 s., (1993)

- [35] Özata, A. ve Kutlu, M. “Enzimoloji Ders Notları”, Anadolu Üniversitesi Fen Fak. Yayınları No.15, Eskişehir, 117 s., (2000)
- [36] Saldamlı, B.(ed) “Gıda Kimyası”, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 527 s., (1998)
- [37] Trotta, F., Drioli, E., Baggiani, C. and Lacopo, D. “Molecular Imprinted Polymeric Membrane for Naringin Recognition”, J. Membrane Sci., **201**: 77-84, (2000)
- [38] Couture, R. and Rouseff, R. “Debitting and Deacidifying Sour Orange (*Citrus aurantium*) Juice Using Neutral and Anion Exchange Resins”, J. Food Scie., **57(2)**: 380-384, (1992)
- [39] Levenspiel, O. “Chemical Reaction Engineering”, John Wiley Inc., New York, 697 s., (1972)



EKLER

Sayfa

Ek 1	Çeşitli Derişimlerde Naringinaz ve Naringin İçeren Çözeltilerdeki Naringin Miktarının Süreye Göre Değişim Grafiklerinden Elde Edilen Başlangıç Tepkime Hızları	58
Ek 2	Ek 2. Farklı Sıcaklık ve pH' larda Sabit Naringinaz ve Naringin İçeren Tepkime Çözeltilerindeki Naringin Miktarının Zamanla Değişim Grafiklerinden Elde Edilen Başlangıç Tepkime Hızları	59

Ek 1. Çeşitli Derişimlerde Naringinaz ve Naringin İçeren özeltilerdeki Naringin Miktarının Süreye Göre Değişim Grafiklerinden Elde Edilen Başlangıç Tepkime Hızları

S_0 , mg/L	E_0 , mg/L				
	50	100	200	300	600
	V_0 , mg/L.dk				
50	0,39	0,8	2	2,5	3,67
100	0,65	1,04	3	3,37	4,01
300	0,85	1,17	3,63	4,52	5,54

Ek 2. Farklı Sıcaklık ve pH' larda Sabit Naringinaz ve Naringin İçeren Tepkime Çözeltisindeki Naringin Miktarının Zamanla Değişim Grafiklerinden Elde Edilen Başlangıç Tepkime Hızları

pH	Sıcaklık, °C		
	40°C	50°C	60°C
	V ₀ , mg/L.dk		
3,50	2,67	2,85	4,09
4,00	3,34	2,76	7,88
4,50	2,44	1,73	6,72

ÖZGEÇMİŞ

Serpil YALIM
Mersin Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü
Çiftlikköy, Mersin 33343

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Hazırlık	: Yabancı Diller Bölümü	Gaziantep Üniversitesi	1994-1995
Lisans	: Gıda Mühendisliği	Gaziantep Üniversitesi	1995-1999
Yüksek Lisans	: Gıda Mühendisliği	Çukurova Üniversitesi	1999-(yatay geçiş)
Yüksek Lisans	: Gıda Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2001-

GÖREVLER

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Gıda Mühendisi	: Yummy Meyve Suları A.Ş.	1999-2001
Arş. Gör.	: Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği	2001-

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi	: 20.01.1977
Doğum Yeri	: Tarsus, Mersin
Yabancı Dil	: İngilizce
Telefon	: 0-324-3610001/ 252
Faks	: 0-324-3610032
E-mail	: syalim@mersin.edu.tr