

**MODEL SİSTEMLERDE ve ELMA SUYUNDA KÜKÜRT DİOKSİT  
VE L-ASKORBİK ASİDİN PATULİN STABİLİTESİNE ETKİSİ**

**Sait Aykut Aytac**

**Hacettepe Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü**

**DOKTORA TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**Ocak-1990**

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

8598


**Aileme ve Seher Ablaya .....**




Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

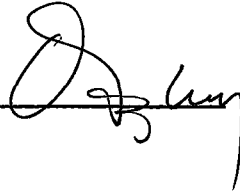
İşbu çalışma, jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalında  
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlbilge SALDAMLI 

Üye : Prof. Dr. Velittin GÜRGÜN 

Üye : Prof. Dr. Sale ACAR 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayhan TEMİZ 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Oya AŞKIN 

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../1990

  
Prof. Dr. Dinçer ÜLKÜ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada pH değeri 3,96 olan ve 5000 µg/l patulin ilave edilmiş McIlvaine tampon çözeltisinde (sitrik asit+disodyum hidrojen fosfat) 25 ppm kükürt dioksit, 100 ppm kükürt dioksit ve % 0,5 oranındaki L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisi incelenmiştir. Ayrıca bu maddelerin tek başlarına tampon çözeltideki stabiliteleri de araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan tampon çözelti örnekleri karanlıkta 15 gün süreyle tutulmuşlar ve bu arada 0., 2., 5., 7. ve 15. günlerde patulin, kükürt dioksit ve L-askorbik asit analizleri yapılmıştır.

Bunun yanında piyasadan sağlanmış sağlam ve beresiz elmalar *Penicillium expansum* ile aşılansarak patulin oluşumu için inkübe edildikten sonra patulinli elma ham suyu elde edilmiştir. Aynı şekilde sağlam elmalardan elde edilen elma ham suyu ile patulinli elma ham suyu, patulin miktarı 6000 µg/l olacak şekilde karıştırılmıştır. Bu şekilde laboratuvar koşullarında hazırlanan elma ham suyu örneklerinin bir kısmına 100 ppm kükürt dioksit ve bir kısmına da 500 mg/l L-askorbik asit katıldıktan sonra elma suyu üretim aşamalarında bu maddelerin patulin stabilitesine etkisi de incelenmiştir. Daha sonra elde olunan berrak elma suyu örnekleri koyu renkli şişelere 180 ml (yaklaşık 200 g) doldurulduktan sonra, kaynar su banyosunda pastörize edilerek oda sıcaklığında 4 ay süreyle depolanmışlardır. Depolama süresi boyunca 2. ve 4. ayda örneklerde patulin, kükürt dioksit, hidroksimetilfurfural, L-askorbik asit ve kuru madde analizleri yapılmıştır.

Çalışma sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1) Tampon çözeltide L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisi kükürt dioksite göre daha az olmuştur. 15. gün sonunda L-askorbik asit ilave edilmiş tampon

çözeltide ortamda patulin saptanamazken, 25 ppm kükürt dioksit içeren örnekte 1600 µg/l, 100 ppm kükürt dioksit içeren örnekte ise 80 µg/l olarak bulunmuştur.

2) Tüm elma suyu örneklerinde en fazla patulin kaybı, % 25 düzeyinde enzimatik durultma ve berraklaştırma aşamasında olmuştur.

3) Elma suyu örneklerinde konsantrasyon ve pastörizasyon işlemlerinin patulin miktarı üzerine etkisi olmamıştır.

4) Depolanan elma suları örneklerinde en fazla kayıp L-askorbik asit katılmış elma suyu örneğinde % 98,0 olarak saptanmıştır. Kükürt dioksit içeren elma suyu örneğinde ise bu kayıp % 94,3 olarak bulunmuştur.

## SUMMARY

In this study, the effects of sulfur dioxide concentration (25 ppm and 100 ppm) and 0,5 % L-ascorbic acid on the stability of patulin have been investigated. Experiments have been carried out in McIlvaine buffer solutions (pH: 3,96) containing 5000 µg/l patulin initially. Furthermore, the stability of each related compound was studied under the same experimental conditions. For this purpose, buffer solutions were stored in the dark at room temperature for 15 days and were analysed for their patulin, L-ascorbic acid and sulfur dioxide contents at 0, 2, 5, 7 and 15-days intervals.

In addition, apples were inoculated with pure cultures of *Penicillium expansum* and incubated for the production of patulin. Then apple juice was prepared under laboratory conditions by using inoculated or noninoculated apples. Both types of apple juices were mixed in order to obtain a final patulin concentration of 6000 µg/l. The juice thus obtained was divided into two batches and 100 ppm sulfur dioxide or 500 mg/l L-ascorbic acid was added to each batch. Furthermore the effects of sulfur dioxide and L-ascorbic acid on the stability of patulin during apple juice production were also studied. Prepared samples (approx. 200 g) were bottled and pasteurized in boiling water and then stored in dark at room temperature for 4 months. Then the samples were analysed for their patulin, L-ascorbic acid, sulfur dioxide, hydroxymethylfurfural and brix contents at the end of second and fourth months of their storage periods.

The results of this study can be summarized as follows:

- 1) The effect of L-ascorbic acid on patulin stability in buffer solutions was less, when compared to the effect of sulfur dioxide. At the end of 15 days, although no

patulin was detected in samples which contained L-ascorbic acid, 1600 µg/l and 80 µg/l of patulin were determined in the ones containing 25 ppm and 100 ppm sulfur dioxide, respectively.

2) The highest patulin decrease (approx. 25 %) was observed in all of the apple juice samples during depectinization and clarification steps.

3) The concentration and pasteurization stages had no influence on the patulin contents of apple juices.

4) The highest decrease of patulin at the end of storage period was determined to be 98 % in apple juice samples in the presence of L-ascorbic acid, whereas the reduction in patulin content was found to be 94,3 % in the samples which contained sulfur dioxide.

**TEŞEKKÜR**

Çalışmanın konusunun belirlenmesinde, planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde değerli katkıları bulunan tez hocam Sayın Prof.Dr.Jale Acar'a teşekkür bir borç bilirim.

Tez çalışması sırasında bana her türlü olanağı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof.Dr.İlbiçe Saldamlı'ya, araştırma sonuçlandırılıncaya kadar yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm bütün bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Araştırmayı maddi yönden destekleyen Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu Genel Sekreterliği'ne teşekkürlerimi sunarım.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
3. MATERYAL VE METOT .....	20
3.1. Materyal .....	20
3.1.1. Test mikroorganizması .....	20
3.1.2. Laboratuvar koşullarında hazırlanan elma suyu .....	20
3.1.3. Model sistem .....	20
3.2. Metot .....	20
3.2.1. Tampon çözeltinin hazırlanması .....	20
3.2.2. Tampon çözeltide patulin tayini .....	21
3.2.2.1. Ekstraktın hazırlanması .....	21
3.2.2.2. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile semikantitatif patulin tayini .....	22
3.2.3. Meyvelerin elma suyuna işlenmesi .....	23

	<b>Sayfa</b>
3.2.3.1. Elma ham suyu eldesi .....	23
3.2.3.2. Enzimatik durultma ve alkol testi .....	24
3.2.3.3. Berraklaştırma .....	24
3.2.3.4. Elma suyu eldesi .....	25
3.2.4. Elma suyunda patulin tayini .....	26
3.2.4.1. Ekstraktın hazırlanması ve kolonda temizleme .....	26
3.2.4.2. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile semikantitatif patulin tayini .....	27
3.2.5. L-askorbik asit tayini .....	28
3.2.6. Kükürt dioksit tayini .....	29
3.2.7. Hidroksimetilfurfural (HMF) tayini .....	29
3.2.8. Kuru madde tayini .....	29
3.2.9. Deneme Planı .....	29
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Tampon Çözeltide Patulin Stabilitesinin İncelenmesi .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1. Kükürt dioksitin tampon çözeltide patulin stabilitesine etkisi .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1.1. 25 ppm seviyesinde kükürt dioksitin etkisi .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1.2. 100 ppm seviyesinde kükürt dioksitin etkisi .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2. L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisi .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. Elma Suyunda Patulin Stabilitesinin İncelenmesi .....</b>	<b>45</b>

**Sayfa**

<b>4.2.1. 100 ppm SO<sub>2</sub> seviyesinde kukürtlenmiş elma suyunda üretim aşamalarında ve depolama süresinde patulin stabilitesi .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2. 500 mg/l seviyesinde L-askorbik asit içeren elma suyunda üretim aşamalarında ve depolama süresinde patulin stabilitesi .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3. Üzum Suyunda Patulin Stabilitesinin İncelenmesi .....</b>	<b>65</b>
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Patulin ile sülfidril grupları arasındaki tahmini reaksiyon mekanizması .....	11
3.1. Örnek ve standartların plaka üzerinde uygulanması .....	27
4.1. 5000 µg/l patulin ile 25 ppm SO <sub>2</sub> ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi .....	34
4.2. 5000 µg/l patulin ile 100 ppm SO <sub>2</sub> ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi .....	38
4.3. 5000 µg/l patulin ile % 0,5 oranında L-askorbik asit ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi .....	43
4.4. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> katılmış elma suyu örneğinde 4 aylık depolama aşamasında patulin miktarındaki azalmalar ile SO <sub>2</sub> içermeyen elma suyunda patulin miktarındaki azalmalar .....	52

**Sekil****Sayfa**

- 4.5. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit katılmış elma suyu örneğinde 4 aylık depolama aşamasında patulin miktarındaki azalmalar ile L-askorbik asit içermeyen elma suyunda patulin miktarındaki azalmalar ..... 62



## ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışmada uygulanan deneme planı .....	30
4.1. 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 25 ppm SO <sub>2</sub> 'in patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide SO <sub>2</sub> ve patulin stabilitesi .....	33
4.2. 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 100 ppm SO <sub>2</sub> 'in patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide SO <sub>2</sub> ve patulin stabilitesi .....	37
4.3. 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde % 0,5 L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide L-askorbik asit ve patulin stabilitesi .....	42
4.4. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> ilave edilen elma ham suyunda patulin ve SO <sub>2</sub> miktarları .....	46
4.5. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> ilave edilen berrak elma suyu örneklerinde patulin, SO <sub>2</sub> ve kuru madde miktarları .....	47
4.6. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> ilave edilen rekonstituye elma suyu örneklerinde patulin, SO <sub>2</sub> , HMF ve kuru madde miktarları .....	49
4.7. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> ilave edilen şişelenerek pastörize edilmiş elma suyu örneklerinde patulin, SO <sub>2</sub> , HMF ve kuru madde miktarları .....	50

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.8. 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO <sub>2</sub> ilave edilen, oda sıcaklığında 4 ay depolanan şişelenmiş pastörize elma suyu örneklerinde patulin, SO <sub>2</sub> , HMF ve kuru madde miktarları .....	51
4.9. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen elma ham suyu örneklerinde L-askorbik asit ve patulin miktarları .....	57
4.10. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen berrak elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit ve kuru madde miktarları .....	58
4.11. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen rekonstituye elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit ve kuru madde miktarları .....	59
4.12. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen, şişelenerek pastörize edilmiş elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit, HMF ve kuru madde miktarları .....	60
4.13. 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen, oda sıcaklığında 4 ay depolanan şişelenmiş pastörize elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit, HMF ve kuru madde miktarları .....	61

## 1. GİRİŞ

Gıda maddeleri doğal floralarında bulunan veya sonradan bulaşan küf mantarları tarafından üretimlerinden tüketimlerine kadar geçen süre içerisinde koşulların da uygun olması durumunda çeşitli bozulmalara uğrayabilmektedirler. Bundan dolayı önemli düzeylerde gıda maddeleri kaybı olduğu gibi bu arada küfler tarafından gıda maddelerinde toksik etkili metabolitler de sentezlenebilmektedir. Küflerin gelişirken gıda maddeleri ve yemler üzerinde oluşturdukları insan ve hayvanlar için toksik etkili bu sekonder metabolitlere mikotoksin, bunların tüketilmesi sonucunda meydana gelen hastalıklara ise mikotoksikosis adı verilmektedir. *Claviceps purpurea*'nın 19. yüzyılda neden olduğu ergotizm olayı bilinen ilk mikotoksikosis olmasına rağmen, bu konudaki ciddi çalışmalar 1960 yılından sonra yapılmaya başlanmıştır. Nitekim 1960 yılında İngiltere'deki küfle bulaşık yer fıstığı küspesi ile beslemeye bağlı olarak hindi yavrularının toplu halde ölmesi sonucu bu konu daha detaylı incelenmiştir. *Aspergillus flavus* tarafından oluşturulan ve hindi yavrularının ölümüne neden olan bu toksine aflatoksin adı verilmiştir. Bundan sonra mikotoksinler konusunda yoğun şekilde çalışmalar yapılmaya başlanmış ve bunların insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalar üzerinde önemli ölçüde zararlı etkileri olduğu belirlenmiştir. Sağlık açısından olumsuz etkileri çoğunlukla kronik olan ancak bununla birlikte bazen akut zehirlenmelere de yol açabilen mikotoksinlerin deney hayvanları üzerinde yapılan uzun süreli deneyler sonucunda mutajen, teratojen, kansorejen ve halluzinojen etkili oldukları saptanmıştır.

Mikotoksinler insan ve hayvan sağlığı açısından önemli oldukları gibi ekonomik kayıplara da neden olmaları dolayısıyla ayrıca önem taşımaktadırlar.



Örneğin ABD'nin güneydoğu eyaletlerinde 1977 yılında mısırlarda aflatoksin kontaminasyonu sonucunda çiftçiler ve hayvan üreticileri 111 milyon Amerikan Doları zarara uğramışlardır (Smith and Moss, 1985).

Bugüne kadar yaklaşık 80-90 mikotoksin ve bunlardan da 10-30 tanesinin değişik varyasyonlarının yapıları saptanabilmiştir. Bazı küf türleri birden fazla farklı mikotoksin sentezleyebildiği gibi değişik küf türleri de, hatta değişik küf cinsleri de aynı mikotoksini sentezleyebilmektedir. Nitekim *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Byssochlamys* cinsi bazı küf mantarları patulin adı verilen bir mikotoksin oluşturmaktadır. Isıya ve düşük pH değerlerine karşı dirençli olan bu mikotoksin antibiyotik, mutajen, kansorejen ve teratojen etki gösterdiğinden insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Lindroth, 1980).

Patulin oluşturabilen küfler meyve ve sebzelerde kolaylıkla üreyebilmekte ve çürümeye neden olabilmektedirler. Meyvelerin meyve suyuna işlenmesi sırasında küflerin zarar görmesine rağmen oluşturdukları bu kansorejen etkili toksik madde suda çözündüğünden kolaylıkla meyve suyuna geçebilmekte ve pastörizasyon sıcaklığında, asit ortamda ve daha sonra depolama sırasında stabilitesini oldukça iyi koruyabilmektedir. Bundan dolayı meyve suları, meyve suyu konsantreleri, meyve pulpu gibi ürünlerde patulin diğer gıdalara göre daha fazla önem taşımakta, özellikle meyve suyuna işlenecek elmaların işlenmeden önce uzun süre fabrikada yığınlar halinde bekletilmelerinden dolayı ticari elma sularında sıklıkla patuline rastlanılmaktadır (Lindroth and Niskanen, 1978; Aping, 1982; Meyer, 1982).

Laboratuvar düzeyinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalara göre meyve sularında görülebilen bu mikotoksin özellikle ortama L-askorbik asit, kükürt dioksit ilavesi sonucunda, katılan miktarlara bağlı olarak inaktive olmaktadır. Ancak

inaktivasyon sonucu oluşan ürünlerin özellikleri ve insan sağlığı açısından toksik olup olmadıkları konusunda henüz yeterli düzeyde çalışmalar yapılmamıştır (Ough and Corison, 1980; Acar ve Arsan, 1988).

Bu çalışmada model sistem ve elma sularında üretim ve depolama sırasında patulin stabilitesi ve L-askorbik asit veya kükürt dioksit ilavesinin bu stabiliteye etkileri incelenmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Patulin, bazı *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssochlamys* türleri tarafından oluşturulan bir metabolittir (Lovett and Peeler, 1973; Rice, et al., 1977; Northolt, et al., 1978; Anonymous, 1986). *Penicillium claviforme*, *P.patulum* (*Sin. P.urticae*, *P.griseofulvum*), *P.expansum* (*P.leucopus*), *P.divergens*, *P.melinii*, *P.equinum*, *P.novae-zeelandiae*, *P.cyclopium*, *P.lanosum*, *P.roqueforti*, *Aspergillus clavatus*, *A.giganteus*, *A.terreus*, *Byssochlamys fulva*, *B.nivea* tarafından oluşturabildiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Wilson and Nuovo, 1973; Frank, et al., 1977; Scott, 1978; Draughon and Ayres, 1979; Frank, 1980; Samson, et al., 1981; Krivobok et al., 1987; El-Banna, et al., 1987; Torres, et al., 1987).

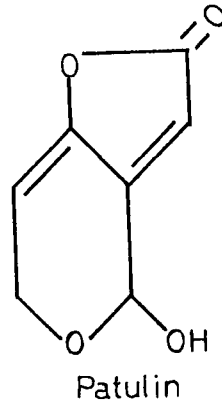
Yukarıda adı geçen küflerin oluşturdukları metabolitler uzun zamandan beri bilinmekle beraber kimyasal yapıları aydınlatılamadığı için farklı küflerin metabolitlerine clavacin, clavatin, claviformin, expansin, gigantic asit, leucopin, mycoin c, penicidin ve terciinin gibi değişik isimler verilmiştir (Lindroth, 1980). Fleming'in bir antibiyotik olan penisilini bulmasından sonra küf metabolitleri konusundaki araştırmalar yoğunlaşmış ve ilk defa 1940 yılında izole edilen patulin de, o zaman antibiyotik olarak kullanılmıştır (Lindroth, 1980). Yapılan araştırmalar sonucunda patulinin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antibiyotik özellik gösterdiği saptanmış ve % 0,01'lik sulu çözeltisi gönüllü hastalarda nezle tedavisinde kullanılmıştır. Ancak uzun süreli tedavi sonucunda ödem, gözde iritasyon ve kan basıncını düşürücü gibi olumsuz yan etkileri saptanmış ve bu metabolitin nezle tedavisinde kullanılamayacağı anlaşılmıştır (Aping, 1982; Acar ve Arsan'dan, 1988). Daha sonra patulinin kimyasal yapısının incelenmesi konusunda yapılan çalışmalarda patulinin lakton yapısında olduğu anlaşılmıştır. Bunun üzerine patulinin toksik özellikleri

yönünde incelemeler yapılmış ve 1961 yılında deney hayvanlarına deri altından verildiğinde kansorejen etkili olduğu saptanmıştır (Lindroth, 1980).

Patulinin kansorejen etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve yapılan hayvan denemelerinde patulinin kansorejen etkisinin yanı sıra mutajen ve teratojen etkili bir metabolit olduğu saptanmıştır. Patulinin karaciğer, dalak, böbrek, gastro-intestinal sistem ve dolaşım sistemi hastalıklarına yol açtığı görülmüştür. Çeşitli araştırmacılara göre LD<sub>50</sub> (mg/kg vücut ağırlığı) değerleri deri altından, damardan, karın boşluğundan ve ağızdan verilise göre farelerde 5,7-48 mg/kg V.A, ratlarda 15-50 mg/kg V.A, hamsterde 10-31,5 mg/kg V.A, köpeklerde 10,4 mg/kg V.A ve civcivlerde 70 mg/kg V.A olarak değişmektedir (Lindroth, 1980).

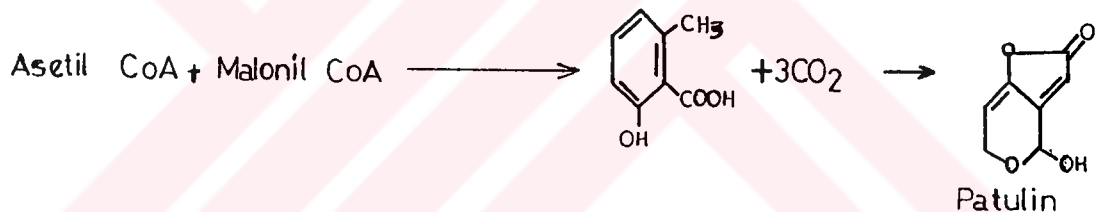
Yapılan araştırmalar patulinin aynı zamanda bitkiler için de fitotoksik özellikte olduğunu göstermiştir. Nitekim Polacco ve Sands'ın 1977'de yaptıkları çalışmaya göre patulin elma polenleri germinasyonunu ve kültüre alınmış soya fasulyesi hücre suspansiyonunun gelişimini inhibe etmiştir (Lindroth, 1980).

Patulinin kimyasal yapısı 1949 ve 1950 yılında Woodward ve Singh tarafından aydınlatılmış olup 4-hidroksi-4H-furo (3,2 c)-piran-2 (6H)- on'dur (Scott and Somers, 1968; Lindroth and Niskanen, 1978; Mortimer, et al., 1985). Struktur formülü aşağıda verilen patulinin kaynama noktası 110-112 °C olup, renksiz bir bileşiktir (Lindroth, 1980; Ough and Corison, 1980).



Patulin doymamış bir lakton olup kapalı formulu  $C_7H_6O_4$  ve molekül ağırlığı 154,12'dir (Koch, et al., 1979). Kloroform, etanol, metanol, etil asetat, aseton ve su gibi çözücülerde iyi çözünmekle birlikte metanol ve suda yavaş bir inaktivasyonu söz konusudur (Pohland and Allen, 1970). Laktonlar, hidroksikarbonik asitin esterleri olup doğada genellikle doymamış halde bulunurlar. Ancak patulin  $\gamma$ -lakton olup, stabil 5- halkası oluşturduğundan dayanıklı bir yapıya sahiptir (Aping, 1982; Acar ve Arsan'dan, 1988).

Patulinin biyosentezi bazı araştırmacılara göre aşağıdaki şekilde olmaktadır (Ough and Corison, 1980).



Patulin de diğer birçok mikotoksin ve sekonder metabolitler gibi aynı şekilde poliketitlerden oluşturulur. Buna göre patulin  $^{14}C$  ile işaretlenmiş glukozdan bir poliketitten acetat-6-metil-salisilik asitten oluşmaktadır. Patulinin biyosentezinde başlangıçta bir asetil CoA ile uç tane malonil CoA birbirleriyle birleşerek molekulden reduksiyon ve dekarboksilasyonla 6-metil-salisilik asit sentezlenmektedir. Daha sonra dekarboksilasyon ve bunu takiben m-hidroksibenzaldehit üzerinden son ürün olarak patulin oluşmaktadır (Lindroth, 1980).

Kufler tarafından patulinin sentezinde kufun suşu, ortamın sıcaklığı, su aktivitesi değeri ( $S_A$ ), pH değeri, süre ve ortamdaki besin maddeleri ile ortamın

ozmotik basıncı önemli rol oynamaktadır. Northolt et al. (1978) yaptıkları çalışmada besiyeri ortamında patulin oluşumunda sıcaklık sınırlarını *P.expansum* için 0-24 °C, *P.patulum* için 4-31 °C ve *A.clavatus* için 12-24 °C olarak saptadıklarını belirtmişlerdir. Aynı şekilde elmada (Golden Delicious) çürüme ve patulin oluşumu için en az 4 °C'ın yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Lindroth et al. (1978), *P.expansum* ile aşılana reçellerde 4 °C ve 22 °C'da patulin oluşumunu incelemişler ve 4 °C'da 22 °C'dan daha az patulin oluşmasına rağmen, sonuç olarak her iki sıcaklık derecesinde de patulin oluşabildiğini saptamışlardır. Bullerman'da (1985), *P.patulum*'un Yeast Extract Sukroz ortamında 5 °C'da 28 günde ve pH 6,5'de 1,8 µg/ml patulin oluşturduğunu tespit etmiştir. Sommer et al. (1974), yaptıkları çalışmada *P.expansum* un Patates Dekstroz sıvı ortamında 0 °C'da yavaş da olsa patulin oluşturabildiğini açıklamışlardır.

Patulin oluşumu için minimum su aktivitesi değerleri *P.expansum* için 0,99, *P.patulum* için 0,95 ve *A.clavatus* için 0,99 olarak belirtilmektedir (Northolt, et al., 1978). Ancak su aktivitesi değerlerinin değişmesine bağlı olarak patulin stabilitesini koruyamıyarak zaman içerisinde inaktive olmaktadır. Nitekim yapılan bir araştırmada farklı su aktivitesindeki unlarda patulinin inaktivasyon sonucu yarılanma süresi 25 °C'da  $S_A$  0,70'de 4,4 gün,  $S_A$  0,90'da ise 1,9 gün olarak saptanmıştır (Harwig, et al., 1977). Ayrıca *P.expansum* ile aşılana 22 °C'da depolanan % 20 ve % 44 sakaroz ilave edilerek farklı seviyelerde su aktivitesi içeren çilek reçellerinde patulin miktarı ile ilgili bir çalışma yapılmış ve sonuçta ilk iki aylık depolama sonucunda su aktivitesi değeri 0,98 olan ve sakaroz ilave edilmemiş örnekte maksimum patulin miktarı 477,8 mg/kg olarak saptanmışken, su aktivitesi 0,96 (% 20 sakaroz) olan örnekte 41,2 mg/kg, su aktivitesi 0,94 (% 44 sakaroz) olan örnekte ise 6,9 mg/kg olarak bulunmuştur (Lindroth, et al., 1978). Aynı araştırmacı siyah frenk üzümü, yaban mersini ve çilek reçelinde yaptığı

çalışmada ise sakaroz katılmamış reçellerde patulin oluşumunun % 20 ve % 44 sakaroz ilave edilerek su aktivitesi değerleri azaltılmış örneklere göre daha fazla olduğunu saptamıştır. 22 °C'da 6 ay süreyle depolanan örneklerde,  $S_A$  değeri 0,98 olan siyah frenk üzümü reçeli ile karşılaştırıldığında patulin oluşumunun  $S_A$  0,94'de 1/100,  $S_A$  0,90'da ise 1/340 oranında daha az olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan aynı deneme yaban mersini reçeli ile yapıldığında  $S_A$  değeri 0,98 olan örnekte patulin oluşumunun  $S_A$  0,95'de 1/80,  $S_A$  0,92'de 1/250 oranında daha az olduğu saptanmıştır.  $S_A$  değeri 0,98 olan çilek reçelinde ise patulin oluşumunun  $S_A$  0,96'da 1/10,  $S_A$  0,94'de 1/70 oranında azaldığı görülmüştür (Lindroth, 1980).

Orth 1974 yılında yaptığı bir çalışmada atmosferdeki % 40 ve üzerindeki  $CO_2$  konsantrasyonunun küf gelişimini ve buna bağlı olarak da toksin oluşumunu azalttığını ve % 90  $CO_2$  bulunan ortamda patulin oluşumunun saptanamadığını belirtmiştir. Ayrıca % 2'lik  $O_2$  konsantrasyonunun da fungal gelişmeyi etkilememekle birlikte toksin oluşumunu azalttığını ve  $O_2$  konsantrasyonunun % 0,2 olması durumunda ise gelişme ve toksin yapımı saptanamadığını belirtmiştir (Northolt and Bullerman, 1982). Lindroth et al. (1978), yaptıkları araştırmada normal atmosferde (% 0,3  $CO_2$ ) ve 22 °C'da muhafaza edilen *P.expansum* ile aşılansız siyah frenk üzümü reçellerinde toksin miktarının 6 aylık depolama sonunda 738,4 mg/kg bulunmasına karşın % 10  $CO_2$  içeren ortamda bu miktarın ancak 2 ay içerisinde maksimum 88,2 mg/kg olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Lindroth (1980), daha sonra yaptığı başka bir çalışmada, atmosferinde %10  $CO_2$  bulunan ortamda ve 22°C'da depolanan reçellerde, normal koşullarda depolanan reçellere göre patulin miktarlarında siyah frenk üzümü reçelinde % 88, yaban mersini ve çilek reçelinde ise % 71 oranında azalmalar saptandığını açıklamıştır.

Patulin oluşumu için pH sınırları 3-6,5 arasında değişmekle birlikte Damoglou and Campbell (1986), yaptıkları çalışmada *P.expansum* ile aşılansarak 25 °C'da inkube edilen elma suyu örneklerinde en fazla patulin oluşumunun pH 3,2 ile 3,8 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Özçelik (1982), *P.expansum*'un % 10 glukoz içeren Czapek-Dox sıvı ortamında 25 °C'da 14 günde en fazla patulini pH 3,5'de oluşturduğunu saptamıştır. Araştırmacı aynı koşullarda patulin oluşumunu pH değerleri 2,5, 5,5, 7,0 ve 9,0 olan besiyerlerinde de incelemiştir. Bullerman (1985), yaptığı çalışmada Yeast Extract Sukroz sıvı besiyerine ekilen *P.patulum* un yine 25 °C'da 14 günde farklı pH'larda patulin oluşturma özelliğini incelemiş ve sonuçta bu küfün en fazla patulini pH 6,5'da 708,0 µg/ml miktarında oluşturduğu halde, patulin miktarı pH 3,5'da 693,6 µg/ml düzeyinde olduğunu bildirmiştir.

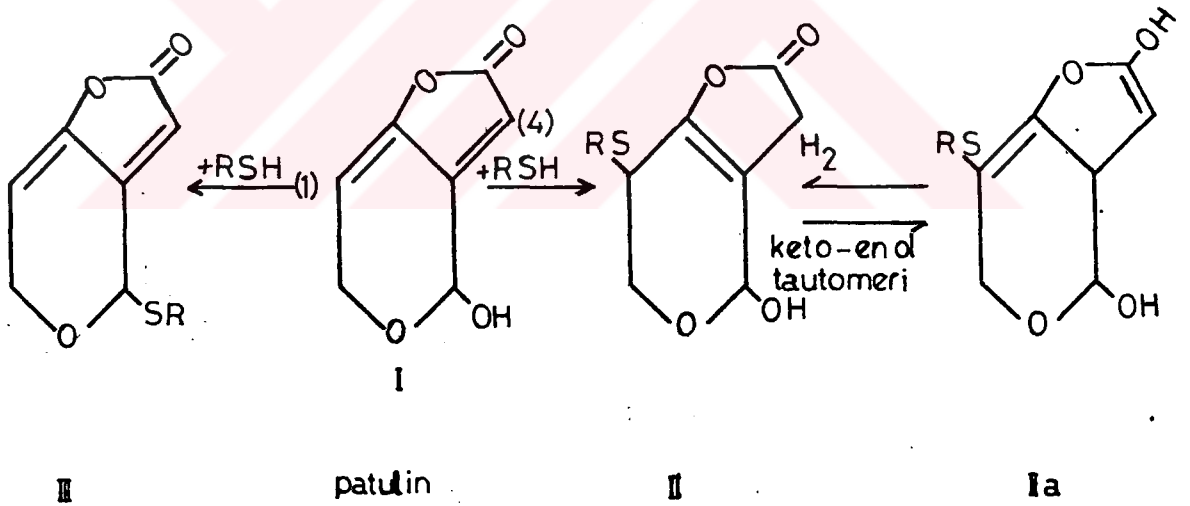
Yapılan araştırmalar ortamdaki karbohidrat niteliğine göre de patulin oluşumunun farklı olduğunu göstermiştir. Özellikle ortamdaki dekstroz, fruktoz gibi şekerler patulin oluşumunu artırmaktadır. Yapılan bir araştırmada *Purticiae* nın patates-dekstroz ortamında, patates-sakaroz ortamına göre daha fazla patulin meydana getirdiği gözlenmiştir (Norstadt and McCalla, 1969). Torres et al. (1987), *P.griseofulvum* un patulin oluşturmalarını ayrı ayrı glukoz ve sakaroz içeren ortamda incelemişler ve sonuç olarak glukozlu ortamda 28 °C'da 25 günde yaklaşık 1300 ppm (1300 mg/l) patulin oluşurken, aynı koşullarda sakarozlu ortamda 300 ppm (300 mg/l) patulin oluştuğunu bildirmişlerdir. Damoglou et al. (1985), yaptıkları araştırmada *P.expansum* un malik asit içeren Czapek-Dox sıvı ortamında ancak 20. günden sonra gelişme gösterebildiğini ve patulin oluşturmadığını saptamıştır. Özçelik (1982), *P.expansum* un farklı karbohidrat içeren ortamlarda patulin oluşturmaları ile ilgili olarak yaptığı çalışmada 25 °C'da, pH



3,5'da ve 10 günlük inkübasyon süresi sonunda en fazla patulinin fruktoz içeren ortamda (887,5 µg/ml buyyon), sonra glukoz (537,5 µg/ml buyyon) ve en sonra da sakaroz (7,2 µg/ml buyyon) içeren ortamda saptadığını bildirmiştir.

Ortamda bulunan bazı maddelerin patulinin stabilitesini etkilediği de belirtilmektedir. Patulinin ortamdaki özellikle sistein, glutation, aktin gibi sülfidril grupları ile reaksiyona girerek inaktive olduğu saptanmıştır. Hoffman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada patulin-glutation bileşiminin patulinin LD<sub>50</sub> değerine göre toksik olmadığını fare, tavuk embriyosu ve tavşana deriden verildiğinde çok az toksik etki gösterdiğini saptamışlardır (Lindroth, 1980). Ciegler et al. (1976), yaptıkları çalışmada patulin-sistein karışımının farelerde toksik etki yapmadığını ancak buna karşılık tavuk embriyosu testinde teratojen etkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Hoffman ve ark. (1971), patulinin sülfidril gruplarıyla inaktivasyonunu konusunda yaptıkları çalışmada, küflenmiş olmalarına rağmen olgunlaşmış et ürünlerinde patulin saptanamadığını ve bunun et ürünlerinde bulunan miyosin, aktin, aktinomyosin, sistein ve glutation gibi sülfidril gruplarından ileri geldiğini, ayrıca bu reaksiyonun pH'ya bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan patulin ile sülfidril grupları arasındaki reaksiyonun pH 7,4'de çok hızlı, pH 6,0'da yavaş ve pH 5,0'da çok yavaş olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar reaksiyon çözeltilerinin pH 7,4'de ve pH 6,0'da farklı UV spektrumu vermelerinden dolayı, patulin ve sülfidril grupları arasındaki reaksiyonun asit ve alkali ortamlarda farklı mekanizmalara sahip olduğu görüşünde olduklarını da bildirmişlerdir (Acar ve Arsan'dan, 1988). Lindroth (1980), yaptığı çalışmada pH'sı 6,0 olan sitrik asit ve sodyum fosfat tampon çözeltisinde 30 dakika içinde patulinin % 94'nün sistein ile reaksiyona girdiğini belirtmiştir.

Hofmann ve ark. (1971), patulin ve sülfidril grupları arasındaki reaksiyon mekanizmasının henüz tam anlamıyla aydınlatılmadığını, ancak sülfidril gruplarının doymamış lakton grubuna -CO-CH=CH- katılımının söz konusu olduğunu öne sürmektedirler. Patulinde basit bir C-C çift bağı olmayıp, bir konjuge dien bulunduğu normal olarak 1,4 katılımı ile reaksiyona girmektedir. Buna bağlı olarak RSH'nın katılımı ile aşağıdaki şekilde belirtildiği gibi II veya II a ürünü oluşur. Ayrıca şekil 2.1'de III ile gösterilen ürünün oluşabileceği de belirtilmektedir (hemiasetal halkaya katılım). Araştırmacılar, oluşan ürünlerin hayvan denemelerinde toksik etkilerinin saptanmadığını da bildirmektedirler (Acar ve Arsan'dan, 1988).



Şekil 2.1 : Patulin ile sülfidril grupları arasındaki tahmini reaksiyon mekanizması (Hofmann, et al., 1971; Acar ve Arsan'dan 1988).

Pohland and Allen (1970), yaptıkları çalışmada patulinin kükürt dioksit ( $\text{SO}_2$ ) ile hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğini ve parçalandığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar başlangıç absorpsiyon maksimumu 277 nm olan patulinin  $5 \cdot 10^{-5}$  M

düzeyindeki sulu çözeltisine makalede belirtilmeyen düzeyde  $SO_2$  katıldıktan sonra 15 dakika içinde bu değerin değiştiğini, 238 ve 309 nm'de iki yeni pik saptadıklarını ve bu piklerin de bir süre sonra tamamen kaybolduklarını bildirmişlerdir. Bu kayıp, araştırmacılara göre kimyasal yapının değişiminden ve patulinin sulu çözeltilerinde  $SO_2$ 'in etkisinin patuline katılımının  $HSO_3^-$  şeklinde gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu katılımın reaktif tiyol grubu için önerilen reaksiyona benzer olabileceği de bildirilmektedir.

Burroughs (1977), elma suyuna 15 ppm (15 mg/l) patulin ve 2000 ppm (2000 mg/l)  $SO_2$  katılması durumunda karışımın % 90'nın iki gün içinde reaksiyona girdiğini belirtmiştir. Ayrıca patulin ile  $SO_2$  arasındaki reaksiyonun pH'sı 3,5 olan tampon çözeltide iki şekilde olabileceğini de açıklamıştır. Buna göre birinci şekilde hemiasetal halkanın açıldığını ve  $SO_2$ 'in aldehite katıldığını ve bu reaksiyonun tersinir olduğunu bildirmiştir. Bu şekilde katılım sonucu oluşan üründe, patulinin konjuge lakton yapısı bozulmamaktadır. İkinci şekilde ise  $SO_2$ 'in çift bağa katıldığını ve reaksiyonun tersinmez olduğunu belirtmiştir. Bu katılımı ise, patulinin konjuge lakton halkasındaki çift bağa katılmakta ve buna bağlı olarak da halka açılmaktadır.

Ough and Corison (1980), yaptıkları araştırmada 25 mg/l patulin içeren üzüm suyuna 100 ppm  $SO_2$  ilavesi sonucunda 15 dakika sonra patulin miktarının  $11,6 \pm 1,37$  mg/l patulin seviyesine düştüğünü saptamışlardır. Adam 1980'de yaptığı çalışmada yüksek konsantrasyonlarda (2000 ppm)  $SO_2$ 'in patulin ile hemen reaksiyona girdiğini bildirmiştir (Scott, 1984).

Yapılan araştırmalar sonucunda ortama askorbik asit ve askorbatların ilavesi ile patulin miktarında önemli azalmalar olduğu görülmüştür. Brackett and Marth (1979 a), 300  $\mu$ g/l patulin içeren elma suyu ve 5000  $\mu$ g/l patulin içeren tampon

çözeltilere C vitamini ilave ederek patulinin parçalanmasını incelemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda % 3 C vitamini eklenmiş tampon çözeltide 8 günde patulinin yaklaşık % 90'nın, % 5 C vitamini ilave edilmiş elma suyunda ise yine patulinin yaklaşık % 90'nın parçalandığını belirtmişlerdir. Acar ve Arsan (1988), elma suyu ve şeftali nektarı örneklerinde çalışmışlar ve 500 mg/l C vitamini ilave ettikleri 1000 µg/l seviyesinde patulin içeren elma suyu örneklerinde 6 aylık bir depolama sonunda patulin saptanamadığını, şeftali nektarında ise başlangıç 1000 µg/l patulin seviyesinin 6. ay sonunda 50 µg/l'ye düştüğünü açıklamışlardır.

Patulin ile L-askorbik asit arasındaki reaksiyon henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Ancak bu konuda bazı görüşler ileri sürülmektedir. Buna göre askorbat veya askorbik asitin bir metal katalizli oksidasyonu olmakta ve bunu takiben bir dizi reaksiyon sonucunda oluşan oksijen atomu patulinin konjuge çift bağı ile reaksiyona girerek patulinin yapısını bozmaktadır (Lindroth, 1980).

Ortamın pH değeri de patulin stabilitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Brackett and Marth'a (1979 b) göre pH değeri 6,0 ile 8,0 arasında değişen Sørensen'in fosfat tampon çözeltisinde patulin kaybı farklı olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre, patulinin yarılanma süresi pH 8,0'da 64 saat olduğu halde, pH 6,0'da 1310 saat olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise 5000 µg/l patulin içeren ve pH'sı 7,5 olan NaOH ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözeltisine % 2 askorbik asit ilavesi ile 5. gün sonunda ortamda artık patulin saptanamamıştır. Aynı seviyede patulin içeren ve pH'sı 3,5 olan yukarıda belirtilen tampon çözeltiye daha fazla seviyede, yani % 3 oranında askorbik asit ilave edildiğinde ise 5. gün sonunda patulinin ancak % 70'nin parçalandığı belirtilmiştir (Brackett and Marth, 1979 a).

Ayrıca ortamda natamycin gibi antibiyotik, sorbatlar, benzoat gibi kimyasallar ile bazı bitki ve baharatın patulin oluşumunu önlediği de çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Ray and Bullerman, 1982; Bullerman, 1983; Bullerman, et al., 1984; Roland, et al., 1984).

Şaraplarda patulinin saptanmaması üzerine bu konuda da çalışmalar yapılmış ve daha önce hammadde patulin içerse bile fermentasyon sırasında patulinin parçalandığı ileri sürülmüştür. Bu konuda Harwig et al. (1973 a), *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces cerevisiae* Y-99 ve *S.cerevisiae* MAC Y2947 suşu ile aşılansarak 25 °C'da 2 hafta süre ile fermente olan elma suları örneklerinde, süre sonunda ortamda çok az veya tespit edilemez miktarda patulin olduğunu saptamışlardır. Ayrıca patulinin birçok kaynaktan antibiyotik özelliği bildirilmekle beraber, 40 µg/ml seviyesindeki patulinin mayanın üremesini çok az veya hiç engellemediği de belirtilmektedir. Burroughs (1977), yaptığı çalışma sonucunda iki farklı *Saccharomyces cerevisiae* suşu ile sentetik ortamlarda gerçekleştirdiği 3 günlük fermentasyon sonunda patulinin ancak % 8-10'nun tayin edilebildiğini belirtmiştir. Stinson et al. (1978), yaptıkları çalışmada 15 mg patulin/l içeren elma sularının mayalar tarafından 23-25 °C'da ve 10-14 gün süreyle fermente edilmesi sonucunda ortamdaki patulinin % 99'nun parçalandığını saptamışlardır. Ough and Corison (1980), 25 mg/l patulin içeren üzüm sularında *Saccharomyces cerevisiae* U.C.D 522 suşunun 15 °C'da gerçekleştirdiği fermentasyon sonucunda patulin miktarının 0,112±0,018 mg/l olarak saptandığını bildirmişlerdir.

Küf gelişmesine bağlı olarak üründe oluşan patulinin difüzyonu gıda maddesine göre değişik olmaktadır. Özellikle elmalarda sadece küf gelişimi görülen yerlerde patulin saptanmakta, diğer kısımlarda ise patulin bulunmamaktadır. Bunun

nedeninin elmadaki hücreler arası boşluklarda bulunan ve elmanın konserve v.b işlenmesi sırasında sorun çıkaran gazlardan olduğu sanılmaktadır. Bu özellik meyve suyu endüstrisinde oldukça önem kazanmakta ve buna bağlı olarak elmadan küf gelişimi görülen çürük kısmın ayrılması ile patulinin % 94,9-100,0 düzeyinde temizlenebileceği belirtilmektedir (Özçelik, 1982).

Kaliteli hammaddeden ürünün işlenmesi halinde meyve suyu konsantratlari ve pulplarının tanklarda depolanması sırasında da koşullar uygun olduğunda tanklardaki ürünün üst kısmında küfler gelişebilmekte ve buna bağlı olarak da patulin oluşturabilmektedir. Suda çözünebilen patulin yüzeyden tüm ürüne geçebilmekte ve küflü kısmın üründen uzaklaştırılması yeterli olmamaktadır (Rehm, 1970; Acar ve Arsan'dan, 1988).

Patulinin lakton yapısında toksik bir madde olmasının anlaşılması ve düşük pH değerlerinde ısıya dirençli olduğunun saptanmasından sonra özellikle yüksek asitli meyve ve sebze ürünlerinde bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle elma sularında patuline sıklıkla rastlanılması bu konudaki çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Elmalar, meyve suyu işletmesinde işlenmeden önce uzun süre yığınlar halinde depolandığından küflenmiş meyve miktarı oldukça fazla olabilmektedir. Bu elmalardan elde olunan meyve suyu gibi ürünlerde bu nedenle patuline sıklıkla rastlanılmaktadır. Harwig et al. (1973 b), doğal olarak küflenmiş 61 farklı elma örneğinin 28'inde 6,02-17,70 mg patulin/elma saptamışlardır. Ayrıca yine 61 elma örneğinin 42'sinde *P.expansum* izole edilmiş ve bunların da patulin oluşturabilen suşlar olduğu belirtilmiştir.

Josefsson and Anderson (1977), İsveç'te satışa sunulan elma sularında yaptıkları çalışmada, inceledikleri 66 örneğin 29'unda 5 µg/l'den fazla miktarda patulin bulunduğunu ve en yüksek değeri 54 µg/l olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ince (1978), Türkiye'de satılan ticari meyve sularında yaptığı araştırmada değişik firmalara ait 260 adet meyve suyu örneğinin incelenmesi sonucunda şeftali nektarlarında 400-1710 µg/l, vişne sularında 710-1710 µg/l, kayısı nektarlarında 1140-1710 µg/l, çilek nektarlarında 700 µg/l, erik nektarlarında 400-700 µg/l ve armut sularında 700 µg/l olarak 24 örnekte patulin saptandığını, buna karşılık elma ve üzüm sularında patulin saptanamadığını açıklamıştır. Ancak bu örneklerde hidrokümetilfurfural tayinleri yapılmamıştır. Diğer taraftan birçok araştırmacı uygun bir yöntem kullanılmadığı takdirde hidrokümetilfurfural ve patulinin birlikte bulunmaları halinde ayrı ayrı tayinlerinin zor olduğunu belirtmektedirler (Koch, et al. 1979; Meyer, 1982).

Lindroth and Niskanen (1978), çift boyutlu ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanarak, Finlandiya'ya ithal edilmiş 64 elma suyu konsantresini incelemişler ve 13 tanesinin 50-590 µg/l miktarları arasında patulin içerdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca inceledikleri 14 adet elma aroması örneğinin 3'ünde 6-1710 µg/l patulin bulunduğunu ve evde yapılmış 20 adet elma suyunun 8 tanesinde 30-16400 µg/l miktarlarında değişen seviyelerde patulin saptadıklarını bildirmişlerdir. Ancak Finlandiya'da üretilen ticari elma suyu konsantresinde saptanamadığını belirtmişlerdir.

Lindroth (1980), daha sonra yaptığı ve yukarıdaki araştırmanın devamı niteliğindeki bir çalışmada 7 tane yöresel elma suyu konsantresinin 2'sinde 460-1450 µg/l seviyesinde patulin saptandığını açıklamıştır. Buna karşılık fermente elma ürünlerinin hiçbirisinde patulin saptanamadığını belirtmiştir. Aynı araştırmacı ayrıca 1975-1980 yılları arasında Finlandiya Teknik Araştırma Merkezi Gıda Araştırma Laboratuvarında yapılan analizler sonucunda 465 meyve-sebze

ürünlerinin 122 tanesinde çeşitli miktarlarda patulin saptandığını da belirtmiştir.

Özcelik (1980), Türkiye'de yetiştirilen bazı elma çeşitleri ile yaptığı çalışmada, patulin üreten küf suşları ve doğal yüzey mikroflorasının (*Penicillium*), 3 °C'da 45 gün süre içerisinde çürüttükleri elmalarda 51,7-210,0 µg/g değerleri arasında patulin oluşturduklarını bildirmiştir.

Domates ürünleri konusunda yapılan bir çalışmada Acar und Klaushofer (1984), Türkiye ve Avusturya'da satışa sunulan 23 adet farklı domates salçası örneğinin hiçbirisinde patulin saptanamadığını belirtmişlerdir.

Mortimer et al. (1985), İngiltere'de piyasada satılan elma ve üzüm sularında HPLC (High performance liquid chromatography) ve gaz kromatografi-kütle spektrometresi ile araştırmalar yapmışlar ve sonuçta inceledikleri üzüm sularının hiçbirisinde tespit edilebilir miktarda patulin saptanamadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar uyguladıkları tayin yönteminde saptanabilir minimum patulin miktarının 5 µg/l olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca elma sularında yaptıkları çalışmada ise 6 örnekte 5-10 µg/l seviyesinde, 4 örnekte ise 16, 18, 36 ve 56 µg/l seviyesinde patulin saptadıklarını açıklamışlardır.

Ayrıca çeşitli ülkelerde elma ve diğer meyve sularında yapılan araştırmalar sonucunda incelenen örneklerde Almanya'da 105 farklı elma ürünü örneğinin % 7'sinde 11-50 µg/l, İtalya'da 58 meyve suyu örneğinin % 21'inde 5-15 µg/l, yine İtalya'da 20 reçel örneğinin % 50'sinde 5-50 µg/l, İngiltere'de 136 meyve suyu örneğinin % 16'sında 1-38 µg/l, Fransa'da 27 elma konsantratu örneğinin hepsinde 55-610 µg/l, İspanya'da 104 elma ürünleri örneğinin % 52'sinde 1-250 µg/l, 24 armut ürünleri örneğinin % 33'ünde 0,9-1,0 µg/l, Yeni Zelanda'da 20



elma suyu örneğinin % 3'ünde 106-216 µg/l seviyesinde patulin saptandığı bildirilmiştir (Mortimer, et al., 1985).

Acar ve Arsan (1988), Marmara ve İç Anadolu bölgelerinde bulunan iki meyve suyu işletmesinden sağlanan ticari meyve suyu ve nektar örneklerinin hiçbirisinde kullanılan yöntem ile tespit edilebilir miktarda patulin saptanmadığını belirtmişlerdir.

Meyve ve sebze ürünlerinde patulin miktarının saptanabilmesi için değişik bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en çok kullanılanı ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz-likit kromatografisi (GLC) ve yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC) yöntemidir. Scott ve Kenedy'nin (1973), önerdiği etil asetat ekstraksiyonu ve siklajel kolon temizleme yöntemi çoğunlukla kullanılan saflaştırma sistemidir ve TLC, GLC ile HPLC yöntemlerinde de kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılanı ucuz, kolay ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle TLC'dir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı standartlarla örneğin karşılaştırılmasının gözle yapılmasıdır. TLC yöntemi ile tespit sınırı 40 µg/l-kg olabilmektedir (Lindroth, 1980).

TLC ile patulin tayininde, özellikle işlenmiş meyve ürünlerinde yüklenen ısının bir göstergesi olan ve uygun olmayan depolama koşullarında oluşan hidroksimetilfurfural (HMF) önemli sorunlara neden olmaktadır. Bu bakımdan son yıllarda patulin ve HMF'in birbirinden kolaylıkla ayrılabilirdiği yöntemler uygulanmaktadır (Koch, et al., 1979; Lindroth, 1980; Acar und Klaushofer, 1984; Acar ve Arsan, 1988).

Patulin ile ilgili çalışmaların hepsi henüz tamamlanamamakla birlikte birçok ülke, gıdalarda bulunmasına izin verilecek maksimum patulin miktarını

sınırlamıştır. Örneğin Lindroth ve ark. 1976'da elma ürünlerinde sınırı 50 µg/l-kg olarak önermişler ve bu değer Finlandiya, Norveç, İsveç ve İsviçre'de 50 µg/l-kg olarak kabul edilmiştir. Dünya Sağlık Teşkilatı da (WHO) sınırın 50 ppb (50 µg/l-kg) olmasını önermektedir (Lindroth, 1980).



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Test mikroorganizması

Denemelerde elma suyunun işlenmesi amacıyla kullanılacak elmalarda patulin oluşumunun sağlanabilmesi için, test mikroorganizması olarak Justus Liebig Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü Giessen Federal Almanya'dan sağlanan *Penicillium expansum* kültürü kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Laboratuvar koşullarında hazırlanan elma suyu

Çalışmada, laboratuvar koşullarında elma suyu üretmek amacıyla piyasadan sağlanmış sağlam ve beresiz Amasya Elması meyve suyuna işlenmiştir. Ayrıca elmaların bir kısmı *P.expansum* ile aşılansın yeterli patulin oluşumu sağlandıktan sonra meyve suyuna işlenmiş ve böylece denemelerde kullanılmak üzere patulinli elma suyu elde olunmuştur.

##### 3.1.3. Model sistem

Araştırmada model sistem olarak McIlvaine çözeltisi kullanılmıştır.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Tampon çözeltinin hazırlanması

Araştırmada tampon çözelti olarak McIlvaine sitrik asit-fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için 21,008 g sitrik asit ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , Merck) 1000 ml saf su içerisinde ve 35,62 g disodyumhidrojenfosfat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ , Merck) 1000 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı elma suyunun pH değerine yakın olması amacıyla, 3,96 olacak şekilde karıştırılarak tampon çözelti hazırlanmıştır (Rauscher, et al., 1972). Sonra tampon çözeltiye 5 mg/l patulin olacak şekilde patulin ilave edilmiş ve tampon çözelti 4 kısma ayrılmıştır. Birinci kısma % 0,5

(5 mg patulin+5 g L-askorbik asit/l) oranında L-askorbik asit, ikinci partiye 25 ppm SO<sub>2</sub> (5 mg patulin+25 ppm SO<sub>2</sub>/l) ve üçüncü partiye de 100 ppm SO<sub>2</sub> (5 mg patulin+100 ppm SO<sub>2</sub>/l) verecek şekilde sodyum piro-sülfid (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Merck) ilave edilmiştir. Dördüncü partiye ise yalnızca 5 mg/l patulin ilave edilerek diğer gruplarla birlikte karanlık bir yerde ağzı sıkıca kapatılmış bir kaptaki tutulmuştur. Tüm gruplar 15 gün süreyle muhafaza edilerek bu süre içinde 0., 2., 5., 7. ve 15. günlerde SO<sub>2</sub>, L-askorbik asit ve patulin analizleri yapılmıştır.

### 3.2.2. Tampon çözeltide patulin tayini

#### 3.2.2.1. Ekstraktın hazırlanması

Tampon çözeltide patulin ekstraksiyonu için Koch et al. (1979) ve Acar und Klaushofer (1984), tarafından önerilen yöntem, yapılan ön denemelerin sonucunda bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır. Örnek UV lambası altında patulinden başka floresan verebilecek renk maddeleri gibi ögeler içermediğinden selit ile temizleme uygulanmadan ve florosilli temizleme kolonundan geçirilmeden doğrudan denemeye alınmıştır. Ayrıca plakalar tek boyutlu geliştirilmiştir.

Bu amaçla McIlvaine tampon çözeltisinden 50 ml örnek ayırma hunisine alınarak 50 ml etil asetat (Merck) ile hızlıca çalkalanmıştır. Bir süre bekletildikten sonra alttaki musluktan önce tampon çözelti fazı sonra etil asetat+patulin fazı alınmıştır. Tampon çözelti tekrar ayırma hunisine alınarak toplam 300 ml etil asetat ile çalkalanmıştır. Etil asetat+patulin fazı ise içerisinde 30 g anhidrit sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck) bulunan erlene alınarak karanlıkta, ağzı iyice kapalı olacak şekilde 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda etil asetat fazı kaba filtre kağıdından süzülerek evaporatör balonuna alınmıştır ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> birkaç defa 10 ml etil asetat ile yıkanmıştır. Sonra rotasyon evaporatörde

(Buchii Evaporatör R 110) 50 °C su banyosu sıcaklığında 20-30 ml'ye kadar hacim küçültülmüştür. Buradan 50 ml'lik küçük armut biçimli balona alınarak etil asetat iyice buharlaştırılmış ve örnek üzerine 1 ml kloroform konarak plakaya uygulanıncaya kadar buzdolabında ağzı sıkıca kapalı bir kaptaki muhafaza edilmiştir (Acar und Klaushofer, 1984).

### 3.2.2.2. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile semikantitatif patulin tayini

Bu amaçla Koch et al. (1979); Acar und Klaushofer (1984), tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. 20x20 cm boyutlarındaki cam plakaların hazırlanmasında Kieselgel 60 HF254 kullanılmıştır. 30 g Kieselgel 60 HF254 ağzı kapalı bir erlen içerisinde 70 ml destile su ile iyice çalkalanmış ve bu karışım bir yayıcıya alınarak plakalar 300 µm kalınlığında kaplanmıştır. Tozsuz bir yerde 10-15 dakika tutulduktan sonra 110 °C'da 2 saat kurutulmuşlardır. Plakalar soğutulduktan sonra plaka kabini muhafaza edilmişlerdir. Örnek ve standartlar plaka üzerinde uygulandıktan sonra tek boyutlu geliştirme için geliştirme tankı hazırlanmıştır. Örneklerde patulin ile birlikte patulin tayininde yanılmalara neden olan HMF bulunmadığından plakalar iki boyutlu geliştirilmemiştir. Geliştirme tankındaki toluol/etil asetat/formik asit (50:40:10 v/v) geliştirilen plakalar kurutulduktan sonra kromatografi tankında 20 ml % 15 KMnO<sub>4</sub> ve 20 ml % 10 HCl çözeltilerinin karışımı ile sağlanan klor atmosferinde 5 dakika bekletilmiştir. Tanktan çıkarılan plakalardan klorun uçabilmesi için plakalar çeker ocakta karanlıkta 5 dakika tutulduktan sonra üzerine o-dianisidinin (Serva) %85'lik formik asit (Merck) içindeki % 4'lük çözeltisi püskürtülmüştür. Plakalar karanlıkta, değerlendirilinceye kadar tutulmuş ve semikantitatif değerlendirilmeleri 15-20 dakika sonra UV (350 nm) lambası (Camag) altında standartlar

ile kıyaslanarak yapılmıştır (Meyer, 1982). Örneklerdeki patulin miktarı bu şekilde aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\mu\text{g patulin/l-kg} = \frac{X \cdot V}{A \cdot E}$$

X: Örnekte (plaka üzerinde) tahmin edilen miktar (ng)

V: Örneğin son hacmi (1 ml kloroform) ( $\mu\text{l}$ )

A: Plakaya taşınan örnek miktarı ( $\mu\text{l}$ )

E: Örneğin başlangıç miktarı (g-ml)

Bu yöntemde ilave edilen patulinin geri alınma oranı % 90-95 olarak saptanmıştır.

### 3.2.3. Meyvelerin elma suyuna işlenmesi

#### 3.2.3.1. Elma ham suyu eldesi

Önce sağlam ve beresiz elmalar *P.expansum* ile aşılansak karanlıkta yaklaşık 20 °C ve % 30 nisbi nem içeren karanlık bir yerde 10 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. 10 gün sonunda elmalarda yeteri kadar patulin oluştuğu saptandıktan sonra elma suyu üretimi için meyveler bir blender (Waring) yardımıyla parçalanmış ve bezden yapılmış torbalara doldurulup preslenerek patulinli elma ham suyu elde edilmiştir. Aşılansak elmalarda oluşan patulin miktarı çok fazla olduğundan ve örneklerde uygun bir başlangıç patulin konsantrasyonu elde etmek amacıyla diğer taraftan da sağlam ve beresiz elmalardan aynı şekilde elma ham suyu elde edilmiştir. Patulin içermeyen elma ham suyu ile patulinli elma

ham suyu, patulin miktarı yaklaşık 6000 µg/l patulin olacak şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra 6000 µg/l patulin içeren elma ham suyu 3 kısma ayrılmış birinci kısma 500 mg/l L-askorbik asit, ikinci kısma 100 ppm SO<sub>2</sub> verecek şekilde sodyum piro-sülfite ilave edilmiş, üçüncü kısma ise hiçbir şey eklenmeden kontrol grubu olarak denemeye alınmıştır. Kükürtleme işlemi için önce 10000 ppm stok sodyum piro-sülfite çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden yararlanılarak kükürtleme yapılmıştır. Daha önce tampon çözelti ile yapılan denemelerde ortamdaki 25 ppm SO<sub>2</sub>'in patulini parçalaması yetersiz olarak saptandığından, daha kesin bir sonuç alabilmek amacıyla 100 ppm SO<sub>2</sub>/l düzeyi tercih edilmiştir.

#### 3.2.3.2. Enzimatik durultma ve alkol testi

Bu şekilde hazırlanan elma ham suyunda enzimatik durultma Cemeroglu'nun (1982) önerdiği şekilde yapılmıştır. Bu amaçla 1:1 oranında su ve elma ham suyu karışımı kullanılmış, Ultrazym 100 G (Swiss Fermented Company Ltd.) enziminin % 2'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 100 ml'ye 0,1 ml olacak şekilde elma ham suyuna ilave edilerek 50 °C'da 2,5 saat tutulmuştur. Süre sonunda enzimatik durultmanın yeterli olup olmadığını belirlemek için alkol testi yapılmıştır. Bu amaçla % 95'lik alkolde % 1'lik konsantre HCl ilavesiyle çözelti hazırlanarak 10 ml elma ham suyuna 20 ml çözeltiden konmuş ve çalkalandıktan sonra 15-20 dakika beklenerek mezurda tortu incelenmiştir.

Mezurda tortu, yumaklaşma olmuş ise depektinizasyona devam edilmiş ve meyve suyuna bir miktar daha enzim çözeltisi ilave edilmiştir.

#### 3.2.3.3. Berraklaştırma

Berraklaştırma işlemi için önce kullanılacak gerekli jelatin miktarı saptanmıştır. Bu amaçla 50 °C'daki saf suyla toz jelatinden (Merck) % 1'lik jelatin

çözeltisi hazırlandıktan sonra 6 tane deney tüpüne ayrı ayrı 10 ml elma ham suyu aktararak bunlara sırasıyla 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 ve 1.0 ml jelatin çözeltisi ilave edilmiştir. Bir süre kendi halinde bekletildikten sonra tüpler incelenip en az jelatinle en iyi berraklaşmış olan tüp seçilerek buradan esas berraklaşmada gerekli olan jelatin miktarı hesaplanmıştır (Cemeroğlu, 1982).

Gerekli jelatin ilavesi yapıldıktan sonra daha önce enzimatik durultma uygulanmış elma ham suyu 1 gece buzdolabında bekletilmiştir.

#### 3.2.3.4. Elma suyu eldesi

Jelatinizasyon işlemi sonunda berrak hale gelen elma ham suyu sifon yapılarak üst kısımdan alınmış ve kaba filtre kağıdından geçirilmiştir. Filtre edilen elma ham suyu rotasyon evaporatörde sürekli ölçümler yapılarak, su banyosu sıcaklığı 90 °C ve balon içerisindeki sıcaklık 60 °C'ı geçmeyecek şekilde konsantre edilerek farklı konsantrasyonlardaki elma suyu konsantratı partileri, son kuru madde % 65,5 olacak şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra bu konsantratlardan kuru madde % 12,5 olacak şekilde saf su ile elma suyu hazırlanmış ve koyu renkli şişelere 180 ml (yaklaşık 200 g) aktarılıp ağızları taç kapak ile kapatılarak kaynar su banyosu içerisinde 30 dakika süre ile pastörize edilmişlerdir. Pastörizasyon işleminden sonra şişeler çatlayıp kırılmamaları için bir süre bekletildikten sonra soğutulularak 4 ay süreyle karanlıkta depolanmışlardır. Bu süre içerisinde örneklerin bulunduğu yerin sıcaklığı (Cole-Parmer Model 3868-00) ile sürekli olarak ölçülmüş ve ortalama 19 °C olarak saptanmıştır.

Karanlıkta tutulan örneklerde 0., 2. ve 4. ay sonunda SO<sub>2</sub>, L-askorbik asit, hidroksimetilfurfural (HMF), kuru madde ve patulin analizleri yapılmıştır.



### 3.2.4. Elma suyunda patulin tayini

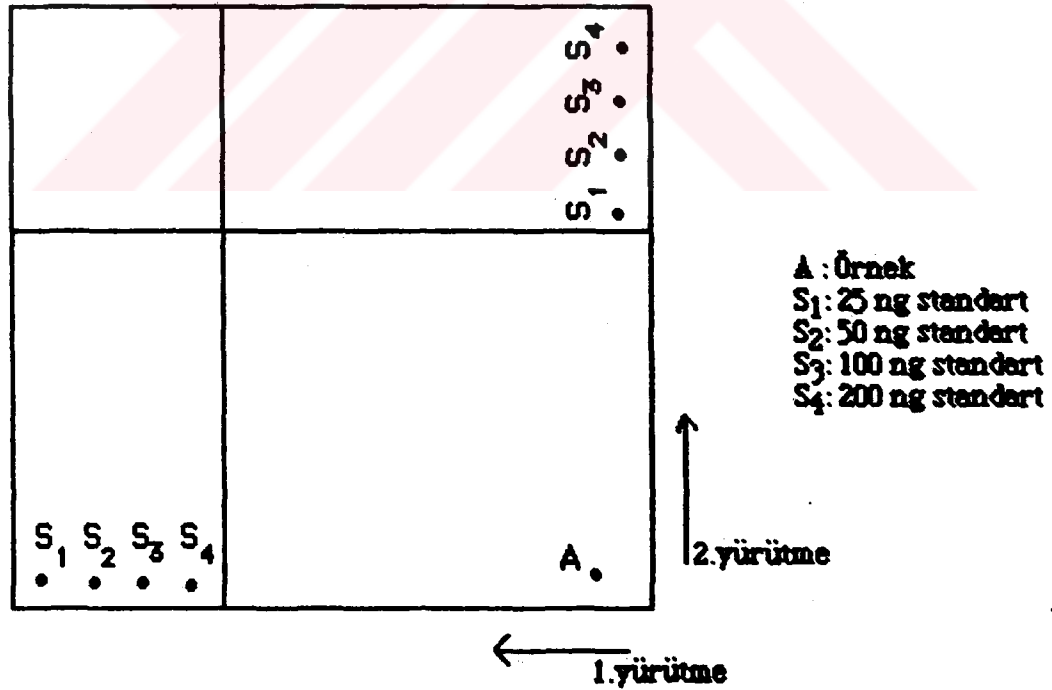
#### 3.2.4.1. Ekstraktın hazırlanması ve kolonda temizleme

Elma suyu örneklerinde patulin ekstraksiyonu için Koch et al. (1979) ve Acar und Klaushofer (1984), tarafından önerilen yöntem bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır. Bu amaçla 50 ml elma suyu örneği 20 g selit (Type 535, 0.01-0.04 mm, Serva) ile iyice karıştırılarak renk maddeleri uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Sonra her defasında 50 ml olacak şekilde toplam 300 ml etil asetat ile yıkanarak Gosch Filtresinden (No: 3) su trombu yardımıyla geçirilmiş ve içerisinde 30 g sodyum sülfat bulunan Nuçe Erlenine alınmış, karanlıkta 1 saat süreyle tutularak suyu uzaklaştırılmıştır. Süre sonunda kaba filtre kağıdından süzülmuş, etil asetat ile birkaç defa yıkandıktan sonra toplam etil asetat fazı rotary evaporatörde 50 °C su banyosu sıcaklığında 20-30 ml'ye kadar hacmi küçültülmüştür. Daha sonra örnek 2,5x55 cm boyutlarında teflon musluklu ve friteli (No: 3) kolonda temizlenmiştir. Kolonun hazırlanması için önce 30-40 ml kadar % 90'lık etil alkol dip kısmında, n-hekzanda (Merck) yağı alınmış pamuk bulunan kolona doldurulmuş ve üzerine 10 g florosil (60-100 mesh, Merck) konarak toplam hacim 70 ml olacak şekilde tekrar % 90'lık etil alkol ilave edilmiştir. Bu şekilde 1 saat bekletilmiş ve florosilin şişerek yapı alması sağlanmıştır. Süre sonunda etil alkol florosil tabakası üzerinde 1 cm kadar kalacak şekilde alttan alınarak kolona üstten yavaş yavaş 20-30 ml n-hekzan ilave edilmiştir. Daha sonra bu da yukarıda belirtildiği şekilde alttan alınarak 25-30 ml etil asetat kolondan geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış kolonda temizlenen örnek ağız traşlı bir balonda toplanmış ve kolon 4 defa 25 ml etil asetat ile yıkanmıştır. Toplam örnek tekrar 30-40 ml'ye kadar buharlaştırılmıştır. Sonra 50 ml'lik armut balona etil asetat ile yıkanarak alınmıştır. Armut balondaki örnek tekrar kuru hale

gelinceye kadar buharlaştırılmış ve hemen 1 ml kloroforma alınmıştır. Örnekler ince tabaka plakasına uygulanıncaya kadar cam kaptaki alüminyum folyeye sarılı halde buzdolabında birkaç gün süreyle muhafaza edilmiştir (Acar und Klaushofer, 1984).

### 3.2.4.2. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile semikantitatif patulin tayini

Bu şekilde hazırlanan örneklerin plakaya uygulanması için önce Bölüm 3.2.2.2'de belirtildiği şekilde plaka hazırlanmıştır. Örnek ve standartlar plaka üzerine Şekil 3.1'de görüldüğü gibi uygulandıktan sonra iki boyutlu ve 10 cm yüksekliğinde geliştirilmiştir.



Şekil 3.1: Örnek ve standartların plaka üzerine uygulanması.

İki boyutlu geliştirme için iki farklı geliştirme tankı Acar und Klaushofer'ın (1984), önerdiği şekilde bazı modifikasyonlarla hazırlanmıştır. Önce benzol/metanol/asetik asitte (90+5+5 v/v) geliştirilen plakaların kurumaları beklenmiş ve 90° çevrilerek toluol/etil asetat/formik asit (50+40+10 v/v) tankında geliştirilmiştir. İki boyutlu geliştirme yöntemi ile patulin ve HMF lekeleri birbirlerinden kesin bir şekilde ayrılabilmiştir.

HMF meyve sularının depolanması sırasında indirgen şekerlerle aminoasitler arasında enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu gerçekleşmesi sonucunda bir araürün olarak oluşmaktadır. Meyvelerde doğal halde bulunmayan bu madde esmerleşme reaksiyonuna bağlı olmaksızın meyve suyuna uygulanan ısı işlemler sonucunda da oluşur. Diğer taraftan HMF miktarı ile uygulanan ısı işlemin sıcaklık derecesi ve süresi arasında doğrusal bir ilişki bulunduğundan, bu madde miktarı meyve sularında bir kalite kriteri olarak değerlendirilmektedir (Cemeroğlu, 1982).

Patulin standart lekelerinin üzerinde bulunduğu doğruların uzatılması halinde 90°'lik açı ile kesiştikleri yerde patulin lekesi, buna karşılık HMF lekesi ise patulin lekesinin biraz altında belirmektedir. Böylece tek yönlü geliştirme yönteminde molekül ağırlıkları çok farklı olmadığı için (patulin 154,12 ve HMF 138, Kieselgur 60 G'de patulin  $R_f=39$ , HMF  $R_f=33$ ) ince tabaka plakası üzerinde birbirlerinden ayrılmaları çok güç olan bu iki madde iki boyutlu yöntemin kullanılması ile kesin bir şekilde ayrılabilir (Meyer, 1982).

### 3.2.5. L-askorbik asit tayini

Örneklerde L-askorbik asit tayini, Anonymous (1951) ve Ceritoğlu (1978) tarafından önerilen, 2-6 diklorofenolindofenol boya çözeltisi kullanılarak spektro-

fotometrik olarak yapılmıştır. Bu amaçla Bausch+Lomb Spectronic 21 spektrofotometresi kullanılmış ve ölçümler 520 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Okunan absorbans değerleri, önceden hazırlanan standart eğri yardımıyla elde olunan formüle uygulanarak L-askorbik asit miktarları saptanmıştır.

### 3.2.6. Kükürt dioksit tayini

Kükürt dioksit tayini için Pearson (1971) tarafından önerilen direkt titrasyon yöntemi kullanılmıştır.

### 3.2.7. Hidroksimetilfurfural (HMF) tayini

Hidroksimetilfurfural (HMF) tayininde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (Anonymous, 1974). Bu amaçla saf HMF [5-(hidroksimetil)-furfural-2-karbaldehit, Merck]'in 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/l'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır. Bausch+Lomb Spectronic 21 spektrofotometresinde örnekteki HMF p-toluidin (Merck) ve barbutirik asidin (Merck) oluşturduğu bileşiğin renk yoğunluğu 550 nm'de ölçülmüş, bu değerler standart eğri yardımıyla elde edilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.2.8. Kuru madde tayini

Örneklere kuru madde tayini refraktometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.9. Deneme planı

Çalışmada uygulanan deneme planı, Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Deneme planında da görüldüğü gibi araştırma patulin ilave edilmiş tampon çözelti ve patulinli elma suyu olmak üzere iki grupta yapılmıştır. Her iki gruba

Çizelge 3.1. : Çalışmada uygulanan deneme planı

Tampon çözelti	L-askorbik asit+Patulin	SO <sub>2</sub> + Patulin	Patulin
	L-askorbik asit	SO <sub>2</sub>	
Patulinli elma suyu	L-askorbik asit	SO <sub>2</sub>	

da ayrı ayrı L-askorbik asit ve SO<sub>2</sub> katılmıştır. Askorbik asit kuvvetli indirgen bir madde olup oksidatif esmerleşme reaksiyonlarına engel olur. Askorbik asit ilavesi bazı pulplarda esmerleşmeyi önlemesi amacıyla kullanılmaktadır. Askorbik asit meyve suyunun depolanması sırasındaki enzimatik olmayan renk değişimine de etkili olması nedeniyle gerektiği takdirde, şişeleme sırasında doğrudan meyve suyuna da ilave edilmektedir. Genel olarak mayşenin her kilosuna 250-300 mg, meyve suyuna ise 200-250 mg yeterli gelmektedir (Cemeroğlu, 1982). Araştırmada yapılan ön denemeler sonucunda ilk başta konulan 250 mg/l L-askorbik asitin hemen tamamının pastörizasyon işleminin sonunda oksidasyon gibi reaksiyonlarla parçalanması nedeniyle çalışmada L-askorbik asit elma ham suyuna 500 mg/l seviyesinde katılmıştır.

Eski zamanlardan bu yana gıda maddelerinin muhafazasında kullanılan SO<sub>2</sub>'in elma suyu konsantrelerinde 100 ppm'e kadar bulunmasına izin verilmesinden

**dolayı ve ön deneme sonuçları gözönüne alınarak çalışmada elma ham sıyu 100 ppm seviyesinde kukürtlenmiştir (Anonymous, 1981).**

**Tampon çözeltide ise patulin ile L-askorbik asit arasındaki reaksiyonun daha belirgin bir şekilde görülebilmesi için 5 g/l olacak şekilde L-askorbik asit ilave edilmiştir. Ayrıca 25 ppm ve 100 ppm SO<sub>2</sub> seviyesinde kukürtlenmiştir.**



## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Tampon Çözeltide Patulin Stabilitesinin İncelenmesi

#### 4.1.1. Kükürt dioksitin tampon çözeltide patulin stabilitesine etkisi

Bazı meyve sularının işlenmesi sırasında düşük düzeylerde kükürtleme yapılmaktadır. Ancak genellikle ilave edilen kükürt dioksit ( $SO_2$ ) uygun düzenlerde üründen tekrar uzaklaştırılabilmektedir (Schobinger, 1987). Bu nedenle denemede  $SO_2$  kullanılarak, bu maddenin meyve suyunda bulunabilen patulinin stabilitesi üzerinde etkisi yanında pH değeri elma suyuna benzer olan tampon çözeltide de  $SO_2$ 'in patulin stabilitesine etkisi de araştırılmıştır.

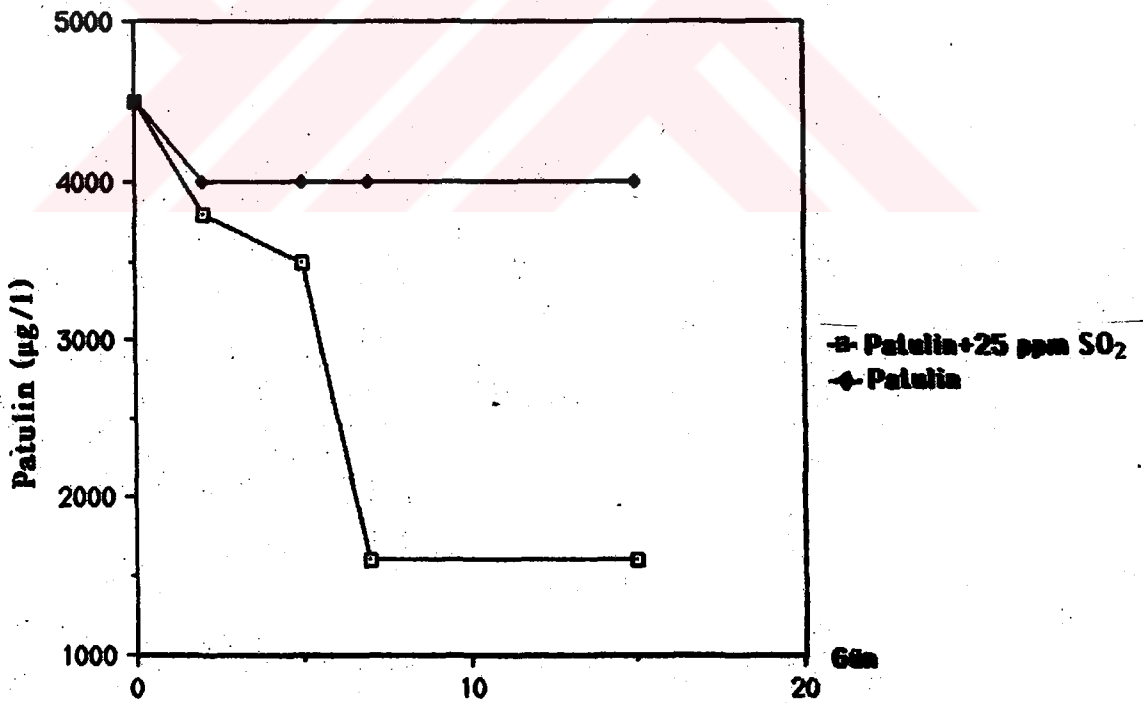
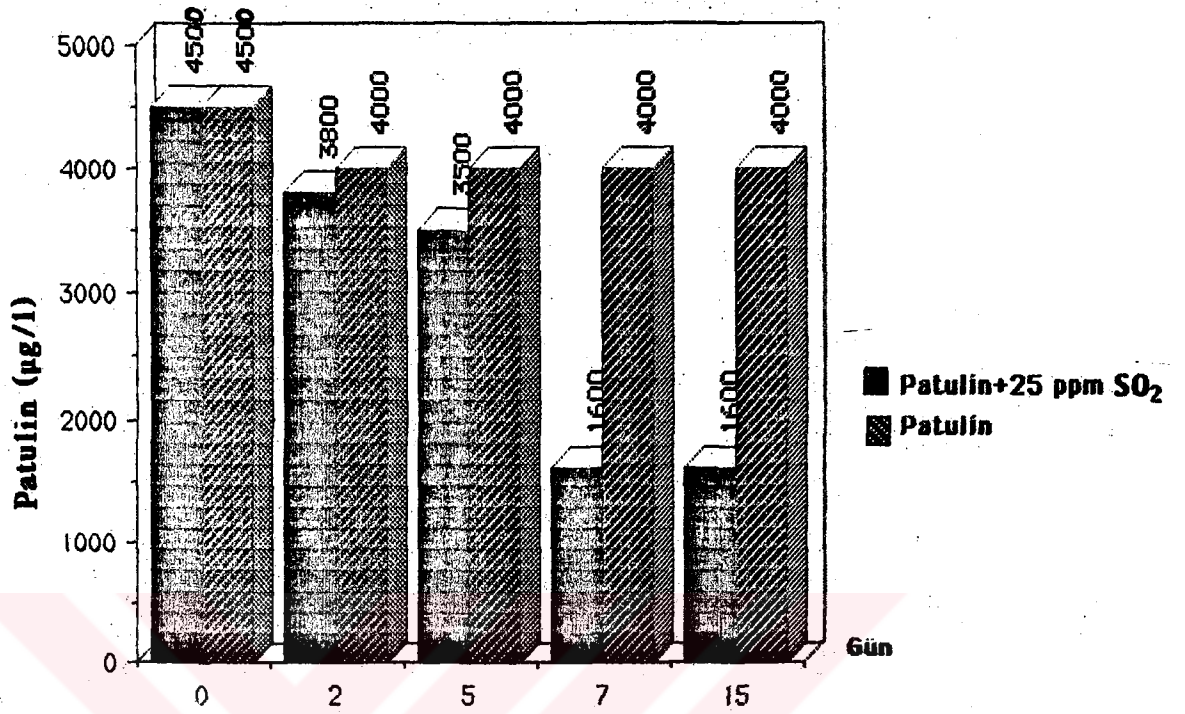
##### 4.1.1.1. 25 ppm seviyesinde kükürt dioksitin etkisi

Kükürt dioksitin ( $SO_2$ ) patulin stabilitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan ve pH değeri elma suyuna benzer olması için 3.96'ya ayarlanan McIlvaine tampon çözeltisi (sitrik asit+disodyum hidrojen fosfat) 3 kısma ayrılmıştır. Birinci kısma 5000  $\mu g/l$  olacak şekilde patulin ilave edildikten sonra 25 ppm seviyesinde  $SO_2$  verecek şekilde sodyum piro-sülfid ( $Na_2S_2O_5$ ) ile kükürtlenerek ağzı sıkıca kapatılıp karanlıkta, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Ayrıca ikinci kısım tampon çözeltisine sadece 25 ppm  $SO_2$  ve üçüncü kısma 5000  $\mu g/l$  patulin ilave edilerek bu iki maddenin ayrı ayrı tampon çözeltide aynı koşullarda stabilitesi de incelenmiştir. Tüm örnekler karanlıkta muhafaza edilmiş ve bu süre içerisinde 0., 2., 5., 7. ve 15. günlerde patulin ve  $SO_2$  analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1'de ve patulin miktarındaki zamana bağlı olarak azalmalar Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. 5000µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 25 ppm SO<sub>2</sub>'in patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide SO<sub>2</sub> ve patulin stabilitesi

GÜN	Tampon çözelti (25 ppm SO <sub>2</sub> +patulin)					Tampon çözelti (25 ppm SO <sub>2</sub> )		Tampon çözelti (5000 µg/l patulin)	
	SO <sub>2</sub> miktarı		Patulin miktarı		ppm	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)	
	ppm	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)					
0	22,4	0	4500	0	22,4	0	4500	0	
2	21,6	3,6	3800	15,6	22,4	0	4000	11,2	
5	20,8	7,1	3500	22,3	22,4	0	4000	11,2	
7	19,2	14,3	1600	64,5	22,4	0	4000	11,2	
15	19,2	14,3	1600	64,5	20,8	7,2	4000	11,2	





Şekil 4.1. 5000 µg/l patulin ile 25 ppm SO<sub>2</sub> ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi.

Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi 0. günde yapılan analiz sonucunda hem 25 ppm seviyesinde kukürtlenmiş ve hem de SO<sub>2</sub> içermeyen tampon çözeltide patulin miktarı 4500 µg/l olarak bulunmuş ve bu başlangıç değeri olarak belirlenmiştir. Patulin tayininde kullanılan ince tabaka kromatografisi yönteminde örneğe verilen patulinin ancak yaklaşık % 90-95'nin saptanabildiği yapılan incelemelerle anlaşıldığından tüm çizelgelerde ve hesaplamalarda başlangıç değeri olarak ilave edilen patulin miktarı olan 5000 µg/l değil, ortama herhangi bir madde katılmadan yalnızca patulin katıldığında 0. günde elde olunan 4500 µg/l değeri alınmıştır. Bütün hesaplamalar buna göre yapılmıştır. Ayrıca her iki örnekte de SO<sub>2</sub> miktarı 22,4 ppm olarak saptanmıştır.

25 ppm SO<sub>2</sub> ve 5000 µg/l patulin ilave edilen örnekte SO<sub>2</sub>'in patulin stabilitesine etkisi belirgin bir şekilde ancak 2. günden sonra başlamış ve patulin miktarında 2. gün sonunda, SO<sub>2</sub> içermeyen örneğe göre 4500 µg/l'den 3800 µg/l'ye %15,6'lık bir azalma görülmüştür. Bu arada SO<sub>2</sub> miktarında 22,4 ppm'den 21,6 ppm'e % 3,6'lık bir azalma belirlenmiştir.

5. gün sonunda yapılan analiz sonucunda ise patulin miktarındaki azalma devam etmiş ve 2. günde saptanan değer olan 3800 µg/l'den 3500 µg/l'ye, başlangıç değerine göre % 22,3 oranında bir azalma olmuştur. SO<sub>2</sub> miktarı ise % 7,2'lik bir azalma ile 20,8 ppm'e düşmüştür.

7. gün analizi sonucunda SO<sub>2</sub> miktarındaki azalma 5. gündeki 20,8 ppm'den 19,2 ppm'e yani başlangıca göre % 14,3 oranında olmuştur. Patulin miktarındaki azalma ise 3500 µg/l'den 1600 µg/l'ye, yine başlangıç değerine göre % 64,5 düzeyinde belirlenmiştir.

Yapılan 15. gün analizi sonucunda ise aynı değerler saptanmış ve patulin ile SO<sub>2</sub> miktarlarında bir denge durumu gözlenmiştir.

Patulin ile birlikte 25 ppm düzeyinde SO<sub>2</sub> içeren tampon çözeltide, SO<sub>2</sub> içermeyen ancak yalnızca patulin içeren tampon çözeltiliye göre patulin miktarındaki azalma daha belirgin olmuş ve başlangıç gözönüne alındığında SO<sub>2</sub> içermeyen sahit çözeltide azalma % 11,2 iken yukarıda belirtildiği gibi 25 ppm SO<sub>2</sub> ve patulin içeren tampon çözeltide ise % 64,5 olmuştur (Şekil 4.1).

Patulin içermeyen 25 ppm seviyesinde kukurtlenen tampon çözeltide ise SO<sub>2</sub> miktarında 7. günde başlangıç 22,4 ppm seviyesine göre azalma olmamış, 15. günde ise % 7,2 azalma ile 20,8 ppm olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

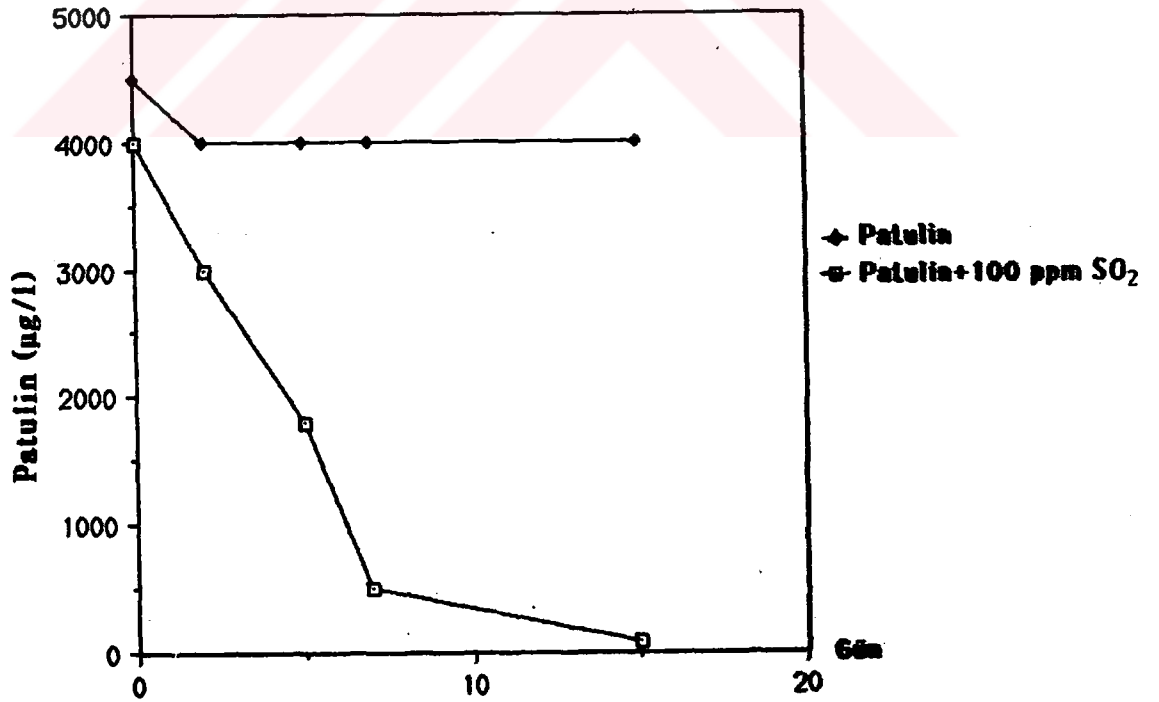
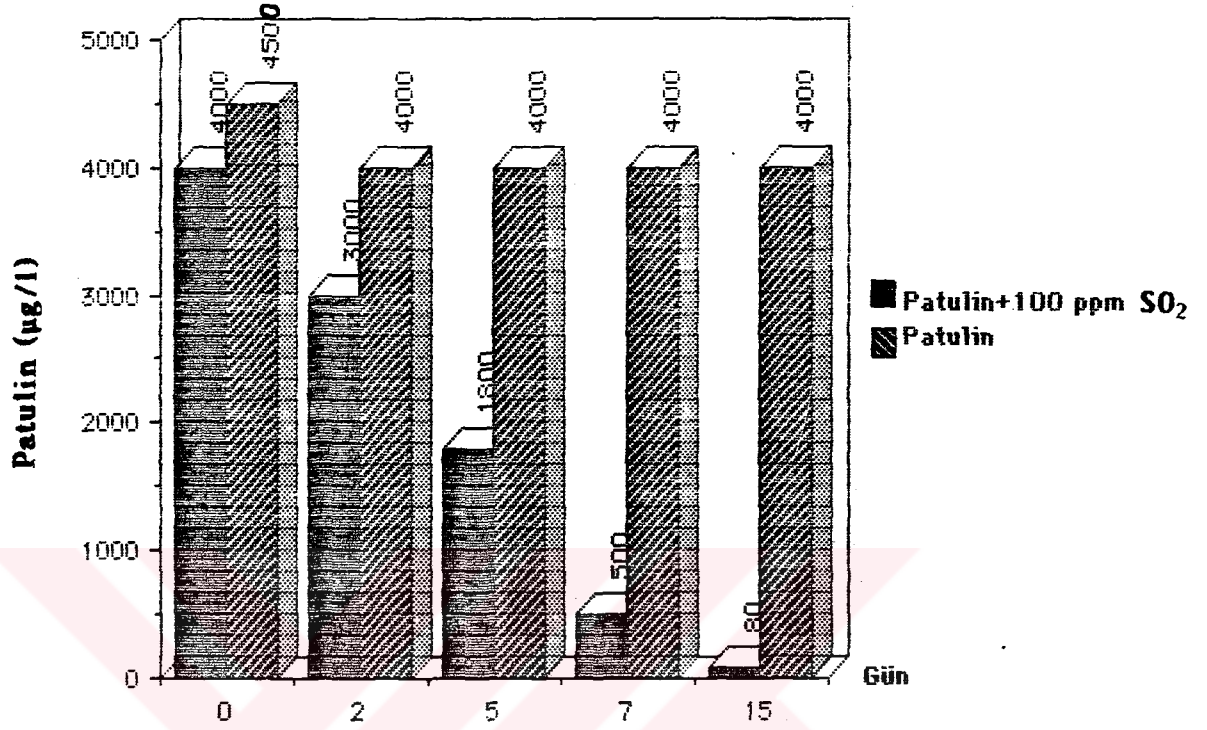
SO<sub>2</sub> içermeyen 5000 µg/l patulin ilave edilen örnekte ise başlangıçta saptanan 4500 µg/l patulin değerine göre 7. günde patulin miktarı % 11,2 azalma ile 4000 µg/l olarak belirlenmiş ve 15. günde yapılan analizde de bunun sabit kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.1).

#### 4.1.1.2. 100 ppm seviyesinde kukurt dioksitin etkisi

Bölüm 4.1.1.1.'de açıklandığı gibi hazırlanan McIlvaine tampon çözeltisi yine uç kısma ayrıldıktan sonra birinci kısma 100 ppm SO<sub>2</sub> verecek şekilde sodyum piro-sulfit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ile birlikte 5000 µg/l patulin, ikinci kısma yalnızca 100 ppm SO<sub>2</sub> ve üçüncü kısma ise yalnızca 5000 µg/l patulin ilave edildikten sonra yine ağzı kapalı kaplarda ve karanlıkta oda sıcaklığında bekletilerek yukarıda belirtilen aralıklarla SO<sub>2</sub> ve patulin analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2'de ve patulin miktarındaki zamana bağlı olarak azalmalar Şekil 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2. 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 100 ppm SO<sub>2</sub> 'in patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide SO<sub>2</sub> ve patulin stabilitesi**

GÜN	Tampon çözelti (100 ppm SO <sub>2</sub> +patulin)						Tampon çözelti (100 ppm SO <sub>2</sub> )		Tampon çözelti (5000 µg/l patulin)	
	SO <sub>2</sub> miktarı		Patulin miktarı		ppm	Azalma (%)	ppm	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)
	ppm	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)						
0	83,2	0	4000	11,2	83,2	0	83,2	0	4500	0
2	82,4	0,9	3000	33,4	83,2	0	83,2	11,2	4000	11,2
5	82,4	0,9	1800	60	83,2	0	83,2	11,2	4000	11,2
7	82,4	0,9	500	88,9	83,2	0	83,2	11,2	4000	11,2
15	77,6	6,8	80	98,3	73,6	11,6	73,6	11,6	4000	11,2



Şekil 4.2.: 5000 µg/l patulin ile 100 ppm SO<sub>2</sub> ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi

100 ppm seviyesindeki SO<sub>2</sub>'in patulin stabilitesine etkisini incelemek amacıyla hazırlanan McIlvaine tampon çözeltisinde Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi patulin ile birlikte SO<sub>2</sub> içeren örnekte 0. günde, SO<sub>2</sub> içermeyen ve yalnızca patulin içeren örneğe göre patulin miktarında 4500 µg/l'den 4000 µg/l'ye yani % 11,2 düzeyinde bir azalma saptanmıştır. 2. günde bu azalma 3000 µg/l'ye % 33,4 oranında gerçekleşmiştir. Bu değer 5. günde 1800 µg/l'ye % 60'luk bir azalma, 7. günde ise % 88,9'luk bir azalma ile 500 µg/l'ye düşmüştür. 15. gün analizi sonucunda ise patulin miktarı % 98,3 düzeyinde bir azalmayla 80 µg/l olarak saptanmıştır (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2).

0. günde yapılan SO<sub>2</sub> analizi sonucunda SO<sub>2</sub> miktarı hem 5000 µg/l patulin ilave edilen hem de ilave edilmeyen örnekte 83,2 ppm olarak tespit edilmiş ve bu değer başlangıç değeri olarak kabul edilmiştir. 2. günde patulin içeren tampon çözeltideki SO<sub>2</sub> miktarı % 0,9'luk bir azalma ile 82,4 ppm olarak belirlenmiştir. 5. ve 7. günde de yapılan analizler sonucunda SO<sub>2</sub> miktarı yine 82,4 ppm olarak saptanmış, 15. günde ise başlangıca göre % 6,8'lik bir azalma ile 77,6 ppm olarak tespit edilmiştir. Burada oda sıcaklığının etkisiyle bir kısım SO<sub>2</sub>'in ortamdaki uzaklaştığı düşünülmektedir.

Sadece patulin içeren tampon çözeltide patulin miktarı başlangıçta saptanan 4500 µg/l patulin değerine göre 7. günde % 11,2 azalmayla 4000 µg/l olarak tespit edilmiştir. 15. günde yapılan analiz sonucunda da aynı değerler bulunmuştur (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi patulin miktarında zamana bağlı olarak sürekli bir azalma olurken patulin içeren tampon çözeltide SO<sub>2</sub> miktarı 0. günde 83,2 ppm olarak ve daha sonra 2., 5. ve 7. günlerde 82,4 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu şekilde SO<sub>2</sub> miktarının sabit kalmasına rağmen patulin miktarında sürekli

bir azalma olmuş ve sonuçta 15. günde patulin miktarı 80 µg/l olarak tespit edilirken SO<sub>2</sub> miktarı 77,6 ppm olarak saptanmıştır. Ayrıca patulin içermeyen ornekteki SO<sub>2</sub> miktarı da, patulin içeren tampon çözeltide olduğu gibi 0. günde 83,2 ppm ve daha sonra 2., 5. ve 7. günlerde 83,2 ppm ve 15. günde 73,6 ppm olarak bulunmuştur.

Görüldüğü gibi patulin içeren ve içermeyen tampon çözeltideki SO<sub>2</sub> miktarları birbirine oldukça yakın değerlerde bulunmuştur. Patulin miktarında 4500 µg/l'den 80 µg/l'ye sürekli bir azalma olmasına rağmen SO<sub>2</sub> miktarlarının hemen hemen aynı bulunmasının nedeninin uygulanan SO<sub>2</sub> tayin yönteminin kaynaklandığı sanılmaktadır. Buna göre çalışmada uygulanan SO<sub>2</sub> tayin yöntemi ile ortamdaki patulin ile reaksiyona girmeyen SO<sub>2</sub>'in yanı sıra patulin ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan patulin+ SO<sub>2</sub> kompleksindeki kükürtlü maddeler de tespit edilmiştir. Pohland and Allen (1970)'e göre patulinin sulu çözeltilerinde ortamda bulunan SO<sub>2</sub>'in patuline katılımı HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> şeklinde gerçekleşmekte ve bu katılımı reaktif tiyol grubu için önerilen reaksiyona benzemektedir (Şekil 2.1).

Çizelge 4.1 ve 4.2'de de görüldüğü gibi konsantrasyona bağlı olarak SO<sub>2</sub> patulin stabilitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Ancak bu etki doğrudan SO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile ilgili olmaktadır. Nitekim 25 ppm seviyesinde kükürtlü örneklerde 15. gün sonunda patulinin % 60'ı parçalanmış iken 100 ppm düzeyinde kükürtlü örneklerde bu değer % 98 olarak saptanmıştır.

Bu konuda bazı benzer çalışmalar da yapılmıştır. Burroughs (1977), patulinin yüksek konsantrasyonlardaki SO<sub>2</sub> ile reaksiyona girdiğini ve buna bağlı olarak patulin miktarının azaldığını belirtmiştir. Araştırmacı yaptığı çalışmada 2000 ppm

SO<sub>2</sub> ile 15 ppm patulin arasındaki reaksiyon sonucunda katılımın iki gün içerisinde % 90 düzeyinde olduğunu bildirmiştir.

Pohland and Allen (1970), elma suyunda patulin ile makalede konsantrasyonunu belirtmedikleri SO<sub>2</sub>'in reaksiyona girdiğini açıklamışlardır.

#### 4.1.2. L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisi

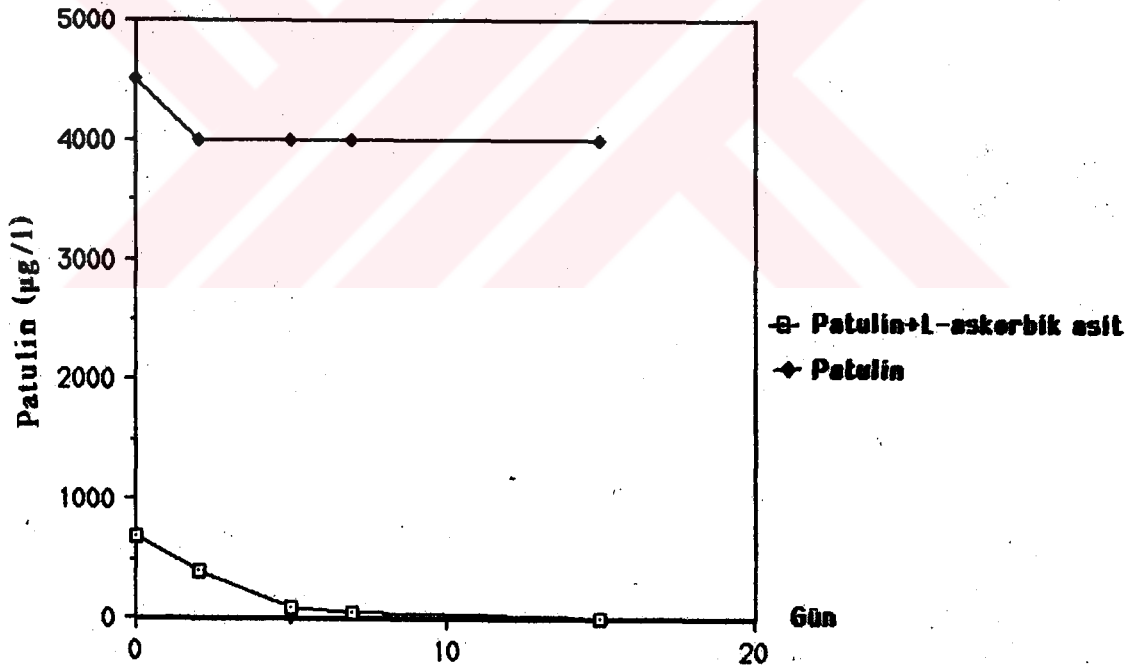
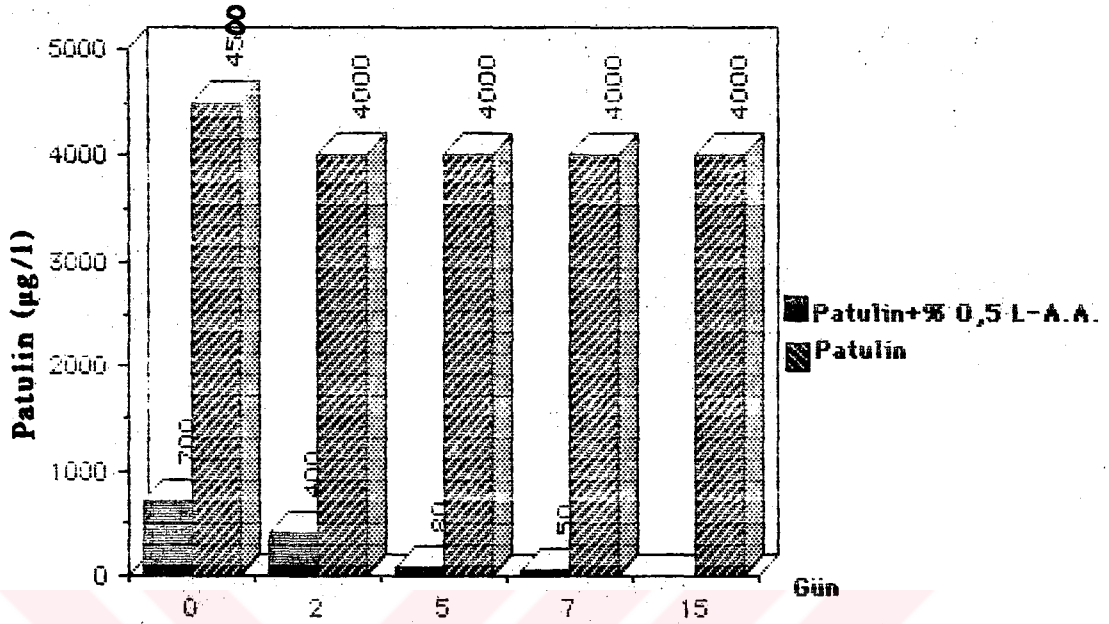
Bölüm 4.1.1.1 ve 4.1.1.2'de belirtildiği gibi McIlvaine tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra üç kısma ayrılmıştır. Birinci kısma L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisini incelemek amacıyla 5000 µg/l patulin ilave edildikten sonra aynı çözeltiye % 0,5 oranında L-askorbik asit eklenmiş ve tüm işlemlerin sonunda çözeltinin pH değerinin 3,96 olması sağlanmıştır. Ayrıca diğer iki kısım tampon çözeltiye yukarıdaki miktarlarda patulin ve L-askorbik asit ayrı ayrı eklenerek bunların tek başlarına tampon çözeltideki stabilitesi incelenmiştir. Tüm örnekler karanlıkta ağızları kapalı kaplarda ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve bu arada 0., 2., 5., 7. ve 15. günlerde patulin ve L-askorbik asit analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3 ve patulin miktarındaki zamana bağlı azalması Şekil 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi ortama % 0,5 oranında L-askorbik asit katılması sonucunda L-askorbik asit ile patulin hemen reaksiyona girmiştir. 0. günde patulin miktarı L-askorbik asit içermeyen tampon çözeltide 4500 µg/l iken L-askorbik asit ilave edilmiş çözeltide 700 µg/l olarak saptanmış ve buna bağlı olarak % 84,5 gibi oldukça büyük bir oranda azalma olmuştur. Bu arada L-askorbik asit miktarı patulin içermeyen tampon çözeltide 267,71±7,08 mg AA/100 ml ve kayıp oranı da şahite göre % 5,7 olarak bulunmuştur.



**Çizelge 4.3. : 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde % 0,5 L-askorbik asit-  
tin patulin stabilitesine etkisi ve tampon çözeltide L-askorbik asit ve patulin stabili-  
tesini.**

GÜN	Tampon çözelti (% 0,5 L-askorbik asit+patulin)				Tampon çözelti (% 0,5 L-askorbik asit)		Tampon çözelti (5000 µg/l patulin)	
	L-askorbik asit miktarı		Patulin miktarı		mg AA/ 100 ml	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)
	mg AA/ 100 ml	Azalma (%)	µg/l	Azalma (%)				
0	252,50±2,79	5,7	700	84,5	267,71±7,08	0	4500	0
2	244,38±1,72	8,8	400	91,2	266,32±5,03	0,6	4000	11,2
5	218,41±0,65	18,5	80	98,3	256,38±1,25	4,3	4000	11,2
7	189,58±1,07	29,3	50	98,9	244,30±1,57	8,8	4000	11,2
15	73,76±1,01	72,5	0	100,0	223,37±2,15	16,6	4000	11,2



Şekil 4.3.: 5000 µg/l patulin ile % 0,5 oranında L-askorbik asit ve sadece 5000 µg/l patulin ilave edilen McIlvaine tampon çözeltisinde 15 günde patulin stabilitesi.

Patulin ve L-askorbik asit içeren örnekte 2. günde başlangıca göre yapılan analiz sonucunda patulin % 91,2'lik bir azalma ile 400 µg/l'ye, L-askorbik asit ise başlangıç miktarı 267,71±7,08 mg AA/100 ml'den 244,38±1,72 mg AA/100 ml'ye, şahite göre % 8,8 lik bir azalma göstermiştir

5. günde patulin miktarındaki azalma başlangıç değeri 4500 µg/l'den 80 µg/l'ye % 98,3 olarak, L-askorbik asit miktarındaki azalma ise 267,71±7,08 mg AA/100 ml'den 218,41±0,65 mg AA/100 ml'ye % 18,5 olarak saptanmıştır.

7. gün analizinde ise patulin miktarındaki azalma şahitte yine 4000 µg/l olarak saptanırken örnekte 50 µg/l olarak saptanmış ve azalma oranı başlangıca göre % 98,9 olmuştur. L-askorbik asit miktarındaki azalma ise 267,71±7,08 mg AA/100 ml'den 189,58±1,07 mg AA/100 ml'ye % 29,3 olarak belirlenmiştir.

15. günde yapılan patulin analizinde ise ortamda artık patulin saptanamamış ve L-askorbik asit miktarındaki azalma ise 73,76±1,01 mg AA/100 ml ile % 72,5 oranında bulunmuştur.

Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi % 0,5 oranındaki L-askorbik asit tampon çözeltide patulin stabilitesini oldukça önemli düzeyde etkilemiş ve 7. günde şahitte saptanan patulinin % 98,9 oranında parçalandığı tespit edilmiştir. Bu konuyla ilgili olarak Brackett and Marth (1979 a) tarafından yapılan bir çalışmada 5000 µg/l patulin içeren pH'sı 3,5 olan tampon çözeltiliye % 0,5 oranında L-askorbik asit eklenerek patulin stabilitesi incelenmiş ve 7. günde patulin miktarındaki azalma yaklaşık % 50 olarak saptanmıştır. 8. günde ise patulin miktarındaki azalma yaklaşık % 55 olarak belirlenmiştir.

Patulin içermeyen % 0,5 L-askorbik asit ilave edilmiş örnekte, başlangıçta saptanan  $267,71 \pm 7,08$  mg AA/100 ml seviyesinde L-askorbik asit miktarı, 7. günde başlangıç değerine göre % 8,8 azalma ile  $244,38 \pm 1,72$  mg AA/100 ml'ye, 15. günde ise % 16,6 azalma sonucunda  $223,37 \pm 2,15$  mg AA/100 ml olarak saptanmıştır.

Sadece patulin içeren tampon çözeltide patulin miktarı başlangıç 4500 µg/l patulin değerine göre 7. günde % 11,2'lik bir azalmayla 4000 µg/l olarak bulunmuştur. 15. günde yapılan analiz sonucunda da aynı değer tespit edilmiştir.

#### 4.2. Elma Suyunda Patulin Stabilitesinin İncelenmesi

##### 4.2.1. 100 ppm SO<sub>2</sub> seviyesindeki kukurtlenmiş elma suyunda üretim aşamalarında ve depolama süresinde patulin stabilitesi

*Penicillium expansum* ile aşılansarak patulin oluşumu sağlanan elmalardan laboratuvar koşullarında elma ham suyu hazırlanmıştır. Elma ham suyunda patulin miktarını istenen düzeyde tutabilmek amacıyla diğer taraftan da sağlam ve beresiz elmalardan yine aynı şekilde patulin içermeyen elma ham suyu da hazırlanmıştır. Sonra patulinli elma ham suyu ile patulin içermeyen elma ham suyu patulin seviyesi yaklaşık 6000 µg/l olacak şekilde karıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen elma ham suyu üç kısma ayrılmış ve birinci kısma hiçbirşey ilave edilmezken, ikinci kısım 100 ppm SO<sub>2</sub> seviyesinde sodyum piroşulfit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ile kukurtlendikten sonra laboratuvar koşullarında endüstriye benzer aşamalar uygulanarak berrak elma suyu ve bu elma suyu da konsantre edilerek elma suyu konsantresi elde olunmuştur. Daha sonra elde olunan elma suyu konsantresine saf su ilave edilerek % 12,5 kuru madde içerikli elma suyu üretilmiştir. Elma suyu üretiminin belli aşamalarında alınan örneklerde patulin ve SO<sub>2</sub> analizleri yapılmıştır.

Başlangıçta 6000 µg/l patulin içeren elma ham suyuna 100 ppm düzeyinde SO<sub>2</sub> ilave edildiğinde patulin miktarı derhal 4500 µg/l'ye düşerken ilave edilen 100 ppm düzeyindeki SO<sub>2</sub> ise 76,8 ppm olarak bulunmuştur. Bu durumda patulin miktarındaki azalma 100 ppm SO<sub>2</sub> ilavesiyle başlangıçta % 25 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilen elma ham suyunda patulin ve SO<sub>2</sub> miktarları.

Örnek	Patulin (µg/l)	SO <sub>2</sub> (ppm)	Patulinde azalma (%)
Patulinli elma ham suyu	6000	—	—
Patulinli elma ham suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	4500	76,8	25

Daha sonra elma ham suyu örneklerinde enzimatik durultma işlemi yapılmıştır. Bu amaçla 1:1 oranında saf su ve elma ham suyu karışımından hazırlanmış % 2'lik Ultrazym G enzim içeren çözelti elma ham suyuna daha önce ön deneme ile saptanan miktarda ilave edildikten sonra 50 °C'da 2,5 saat bekletilmiştir. Enzimatik durultmanın tamamlandığının belirlenmesi amacıyla alkol testi yapılmış ve enzimatik durultma işleminden sonra berraklaştırma işlemi için elma ham suyu örneklerine yine ön deneme ile saptanan belli oranda jelatin çözeltisi ilave edilerek 1 gece buzdolabında bekletilmiştir. Bu süre sonunda berrak hale gelen elma ham suyu üstten alınarak kaba filtre kağıdından süzül-

dukten sonra örneklerde yapılan kuru madde, patulin ve SO<sub>2</sub> analizlerinin sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilen berrak elma suyu örneklerinde patulin, SO<sub>2</sub> ve kuru madde miktarları.

Örnek	Patulin (µg/l)	SO <sub>2</sub> (ppm)	Kuru madde (%)	Patulinde azalma (%)*	Patulinde azalma (%)**
Patulinli berrak elma suyu	4500	—	12,5	25	25
Patulinli berrak elma suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	3500	59,2	12,5	41,7	22,3

\* : Başlangıç 6000 µg/l patulin miktarına göre toplam azalma.

\*\* : Sadece enzimatik durultma ve berraklaştırma işleminde görülen azalma.

Çizelge 4.5'de de görüldüğü gibi yalnızca patulin içeren elma ham suyuna enzimatik durultma ve berraklaştırma uygulandıktan sonra elde olunan berrak elma suyunda patulin miktarında % 25 düzeyinde bir azalma saptanmıştır. 100 ppm düzeyinde SO<sub>2</sub> ilave edilen patulinli elma ham suyunda SO<sub>2</sub> ilavesinden sonra patulin miktarı 6000 µg/l'den 4500 µg/l'ye düştüğünden başlangıç değeri 4500 µg/l patulin olan örnekte enzimatik durultma ve berraklaştırma patulin miktarında % 22,3 düzeyinde bir azalmaya neden olmuştur. Ancak başlangıç patulin miktarı olan 6000 µg/l değeri gözönüne alınırsa başlangıca göre bu azalma % 41,7'dir.

Durultma işleminden sonra elde edilen berrak elma suyu, su banyosu sıcaklığı 90 °C'da olan, balon içindeki ürün sıcaklığı ise 60 °C'ı geçmeyecek şekilde Rotary evaporatörde konsantre edilmiştir. Bu şekilde sağlanan birbirine yakın ancak farklı miktarlarda kuru madde içeren elma suyu konsantratlari, son kuru madde değeri % 65,5 olacak şekilde karıştırılmıştır. Sonra bu konsantratlari tekrar başlangıç ürünü olan berrak elma suyunda olduğu gibi kuru maddesi % 12,5 olacak şekilde saf su ile karıştırılarak elma suyu elde edilmiştir. Bu elma suyu örneklerinde kuru madde, patulin, SO<sub>2</sub> ve HMF analizleri yapılmıştır.

HMF meyve sularında indirgen şekerlerle aminoasitler arasındaki reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmakta ve meyve suyundaki miktarı 5 mg/l'den fazla olması durumunda bazı araştırmacılara göre kusur sayılmaktadır (Can ve Ekşi, 1983). Molekül ağırlıkları çok farklı olmadığı için (patulin 154,2, R<sub>f</sub>:39; HMF 138, R<sub>f</sub>:33) ince tabaka plakası üzerinde patulin ile HMF'in birbirlerinden ayrılmaları çok güç olmaktadır. Ancak bu iki madde iki boyutlu ince tabaka kromatografisi ile birbirlerinden ayrılabilir. Ayrıca HMF'in rengi patuline göre biraz daha kırmızı tonda olmakta, deneyimli kişilerce patulin lekesi ile üst üste bulunmadığı zaman farkedilebilmektedir.

Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi rekonstitüye edilen elma suyu örneklerinde patulin miktarlarında berrak elma suyuna göre hiçbir farklılık saptanmamıştır ve patulin miktarları berrak meyve suyunda olduğu gibi SO<sub>2</sub> içermeyen örnekte yine 4500 µg/l, SO<sub>2</sub> içeren örnekte ise 3500 µg/l olarak saptanmış ve buna bağlı olarak % azalma oranlarında da bir değişme görülmemiştir.

Çizelge 4.6 : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilen rekonstitüye elma suyu örneklerinde patulin, SO<sub>2</sub>, HMF ve kuru madde miktarları.

Örnek	Patulin (µg/l)	SO <sub>2</sub> (ppm)	Kuru madde (%)	HMF (mg/l)
Patulinli elma suyu	4500	—	12,5	*
Patulinli elma suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	3500	25,6	12,5	*

\* : HMF saptanmamıştır.

SO<sub>2</sub> miktarı ise 25,6 ppm olarak belirlenmiştir. SO<sub>2</sub>'in evaporasyon sırasında su buharı ile uzaklaştığı düşünülmektedir. Diğer taraftan SO<sub>2</sub> içeren meyve sularından SO<sub>2</sub>'in ayrılması için de benzer teknikler kullanılmaktadır.

Kuru madde miktarı yukarıdaki gibi ayarlanan elma suyu, daha önce yıkanıp temizlenmiş koyu renkli şişelere 180 ml (yaklaşık 200 g) olacak şekilde doldurulup, şişelerin ağzı taç kapak ile kapatılarak kaynar su banyosu içerisinde 30 dakika süre ile pastörize edilmiştir. Pastörizasyon işlemi şişelerin tamamen su içinde olmalarına özen gösterilmiştir. Daha sonra şişeler mümkün olduğunca hemen soğutulmuş ve yine örneklerde kuru madde, patulin, SO<sub>2</sub> ve HMF analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.



**Çizelge 4.7 : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilen şişelenerek pastörize edilmiş elma suyu örneklerinde patulin, SO<sub>2</sub>, HMF ve kuru madde miktarları.**

Örnek	Patulin (µg/l)	SO <sub>2</sub> (ppm)	Kuru madde (%)	HMF (mg/l)	Patulinde azalma (%)*
Patulinli elma suyu	4500	—	12,5	$0,63 \pm 1,2 \times 10^{-3}$	25,6
Patulinli elma suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	3500	19,3	12,5	$0,12 \pm 1,6 \times 10^{-4}$	41,6

\* : Başlangıç 6000 µg/l patulin miktarına göre

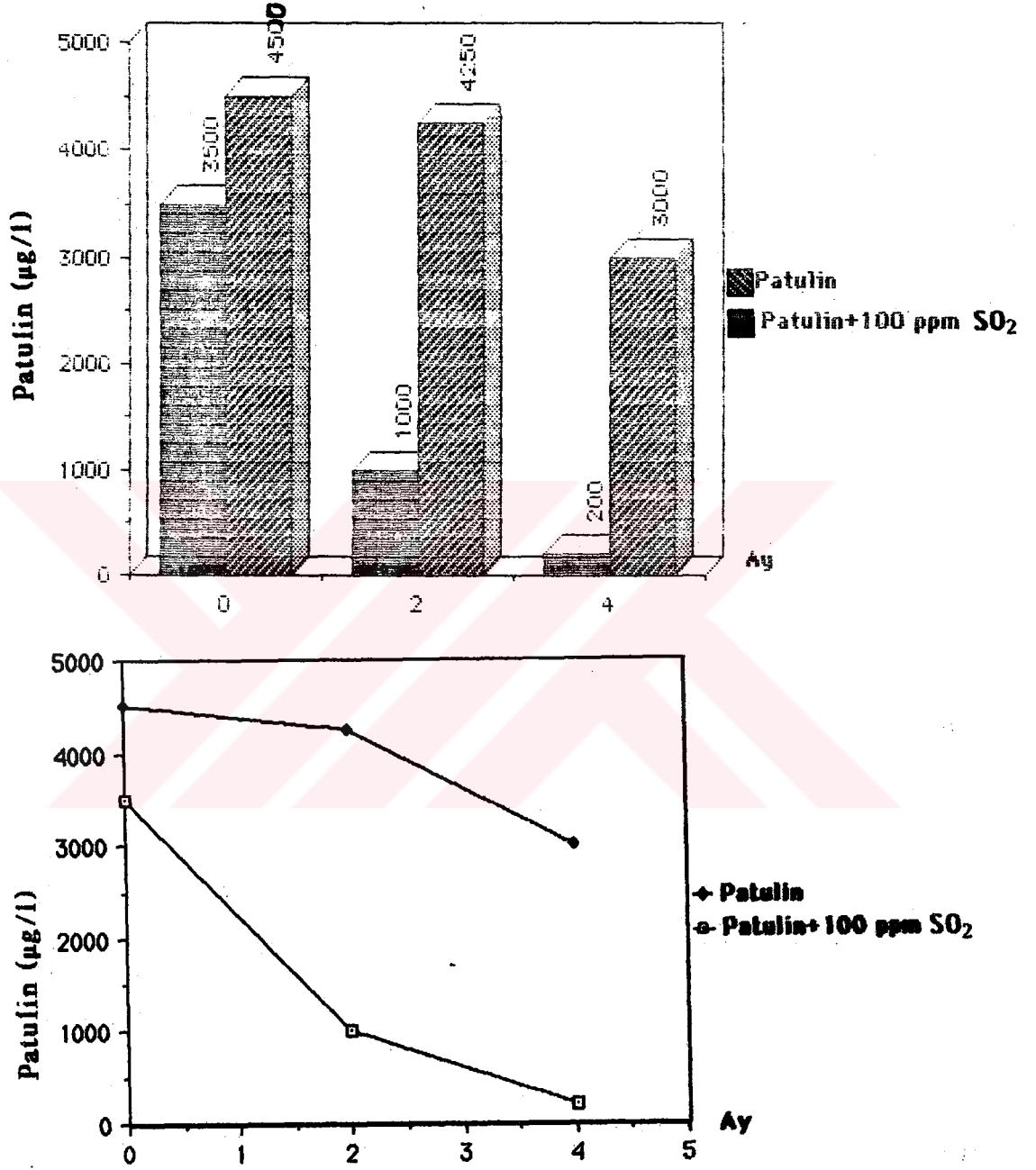
Hem SO<sub>2</sub> katılan ve hem de SO<sub>2</sub> katılmayan, şişelenmiş elma suyu örneklerinde patulin miktarında pastörizasyondan sonra yine hiçbir değişme saptanmamış ve SO<sub>2</sub> içermeyen patulinli elma suyunda patulin miktarı 4500 µg/l, SO<sub>2</sub> içeren patulinli elma suyunda ise 3500 µg/l olarak bulunmuştur. Bu arada SO<sub>2</sub> miktarı da 19,3 ppm olarak belirlenmiştir. SO<sub>2</sub>'in pastörizasyon sırasında ısının etkisiyle buharlaşıp şişenin tepe boşluğunda toplandığı düşünülmektedir.

Bu örneklerde HMF miktarları ise SO<sub>2</sub> içermeyen patulinli elma suyunda  $0,63 \pm 1,2 \times 10^{-3}$  mg/l, SO<sub>2</sub> içeren patulinli elma suyunda ise  $0,12 \pm 1,6 \times 10^{-4}$  mg/l olarak tespit edilmiştir. Ortamda bulunan SO<sub>2</sub>'in HMF oluşumunu belli bir düzeyde engellediği görülmektedir. SO<sub>2</sub>'in enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarını engellediği de bilinmektedir (Cemeroglu ve Acar, 1986).

Ağız kapalı şişelerde bulunan pastörize elma suyu örnekleri, zaman içerisinde patulin stabilitesini incelemek amacıyla 4 ay süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında tutulmuşlardır. Örneklerde 2. ve 4. ay sonunda kuru madde, patulin, SO<sub>2</sub> ve HMF analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Ayrıca depolama süresine bağlı olarak patulinde meydana gelen azalmalar da Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Aynı şekilde SO<sub>2</sub> içermeyen elma suyu örneklerindeki patulin miktarındaki azalmalar da belirtilmektedir.

Çizelge 4.8 : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilen, oda sıcaklığında 4 ay depolanan şişelenmiş pastörize elma suyu örneklerinde patulin, SO<sub>2</sub>, HMF ve kuru madde miktarları

Süre	Örnek	Patulin (µg/l)	SO <sub>2</sub> (ppm)	HMF (mg/l)	Kuru madde (%)	Depolama süresinde azalma (%)
2. Ay	Patulinli elma suyu	4250	—	1,27±0,03	12,6	5,6
	Patulinli elma suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	1000	8	0,74±0,21	12,6	71,5
4. Ay	Patulinli elma suyu	3000	—	2,23±0,10	12,6	33,4
	Patulinli elma suyu + 100 ppm SO <sub>2</sub>	200	7,2	0,90±0,00	12,6	94,3



**Şekil 4.4. : 6000 µg/l patulin içeren ve 100 ppm SO<sub>2</sub> katılmış elma suyu örneğinde 4 aylık depolama aşamasında patulin miktarındaki azalmalar ile SO<sub>2</sub> içermeyen elma suyunda patulin miktarındaki azalmalar**

Çizelge 4.8'de de görüldüğü gibi 2 aylık depolama sonunda yapılan analizlerde patulin miktarında bir azalma görülmüştür. SO<sub>2</sub> içermeyen örnekte depolama başlangıcında 4500 µg/l olan patulin miktarı % 5,6 azalarak 4250 µg/l'ye düşmüştür. Patulin miktarındaki azalmanın nedeni patulinin sulu çözeltilerde stabil olmamasıdır (Pohland and Allen, 1970). Diğer taraftan Acar ve Arsan da (1988), yaptıkları çalışmada hiçbirşey ilave edilmemiş elma suyunda 6 aylık depolama sonunda patulin miktarında % 20 azalma saptamışlardır.

Çalışmamızda başlangıç patulin miktarınının 6000 µg/l olduğu gözönüne alınırca SO<sub>2</sub> içermeyen örnekte işleme aşamaları ve 2 aylık depolamadan sonra patulin düzeyi % 29,1 oranında azalmıştır. SO<sub>2</sub> içeren örnekte ise patulin miktarındaki % azalmalar 2 aylık depolamada % 71,5 ve baştan itibaren ise % 83,4 düzeyinde olmuştur.

4 aylık depolama sonucunda ise örneklerde patulin miktarınının daha da azaldığı saptanmıştır. Depolama başlangıcına göre SO<sub>2</sub> içermeyen örnekte patulin miktarı %33,4 azalırken SO<sub>2</sub> içeren örnekte ise azalma % 94,3 düzeyinde olmuştur. Başlangıç değerleri gözönüne alınırca tüm işlemler ve 4 aylık depolama sonucunda SO<sub>2</sub> içermeyen örnekte patulin miktarı % 50 azalırken, SO<sub>2</sub> içeren örnekte % 96,7 düzeyinde azalmıştır.

Bu örneklerde SO<sub>2</sub> miktarı ise ikinci ay sonunda 8 ppm, 4. ay sonunda ise 7,2 ppm olarak saptanmıştır.

Patulin içeren meyve sularında ortama herhangi bir madde katılmadığı halde bile patulin miktarınının azalması ile ilgili diğer bazı çalışmalar da bulunmaktadır.

Scott and Somers (1968), 22 °C'da karanlıkta depolanan ve 200 mg/ 50 ml patulin içeren elma ve üzüm suyu örneklerinde patulin miktarlarında 3 ay sonunda % 20-25, 5. ay sonunda ise % 50-60 azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Wheeler et al. (1987), yaklaşık 20 µg/ml patulin içeren elma ciderrının 22 °C'da 1 ay süreyle depolanması sonucunda patulin miktarında değişme olmadığını bildirmişlerdir.

Acar ve Arsan (1988), elma suyunda yaptıkları bir çalışmada patulin miktarındaki azalmanın 6 aylık depolama sonunda 350 µg/l'den 280 µg/l'ye % 20 olarak açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar patulin içeren şeftali nektarındaki azalma oranını da 950 µg/l'den 150 µg/l'ye % 84,3 olarak bulmuşlardır.

HMF miktarları ise patulinli elma suyu örneğinde 2. ay sonunda  $1,27 \pm 0,03$  mg/l, 4. ay sonunda  $2,23 \pm 0,10$  mg/l, SO<sub>2</sub> içeren patulinli elma suyu örneğinde ise 2. ay sonunda  $0,74 \pm 0,21$  mg/l, 4. ay sonunda ise  $0,90 \pm 0,00$  mg/l olarak saptanmıştır.

Görüldüğü gibi örneklerde HMF miktarı depolama süresinin uzaması ile bir artış göstermektedir. Ancak ortamda bulunan SO<sub>2</sub> bu artışı belli bir düzeyde engelleyebilmektedir.

Acar ve Arsan (1988), elma suları ve şeftali nektarı ile yaptıkları denemelerde depolama süresinin uzaması ile örneklerde HMF miktarlarının arttığını bildirmektedirler. 6 aylık depolama sonucunda örneklerde HMF miktarının arttığını ancak ortamda bulunan C vitamininin bu konuda etkili olmadığını da açıklamışlardır.

Ancak bu çalışmada amaç örneklerde işleme ve depolama sırasında HMF oluşumunu incelemek olmayıp, patulin ve HMF'in kromatografik yöntemlerle

tainlerinde sıklıkla birbirleriyle karıştırılabilmeleri nedeniyle HMF miktarını da incelemektir.

SO<sub>2</sub>'in patulin stabilitesine etkisi bu maddenin elma ham suyuna ilavesiyle ilk anda olmuş ve depolama süresinin uzamasıyla birlikte patulin miktarında da azalmalar görülmüştür. Elma ham suyunun 100 ppm seviyesinde kukurtlenmesi sonucunda patulin miktarında ilk anda 6000 µg/l'den 4500 µg/l'ye yani % 25'lik bir azalma olmuştur. Daha sonraki enzimatik durultma ve berraklaştırma aşamasındaki kayıplar ise SO<sub>2</sub> içermeyen gruptaki örneklerle aynı oranda saptanmış ve patulin seviyesinde SO<sub>2</sub> ilavesinden dolayı önemli bir azalma görülmemiştir. Ancak depolama aşamasında SO<sub>2</sub> içeren örneklerde patulin miktarındaki kayıplar artmış ve 4 aylık depolama sonunda başlangıç 6000 µg/l patulin seviyesine göre azalma toplam % 96,7 olarak tespit edilmiştir. SO<sub>2</sub>'in meyve suyundaki patulin stabilitesi üzerine etkisi diğer bazı araştırmacılar tarafından da incelenmiştir.

Adam 1980 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada elma sularının 100 ppm SO<sub>2</sub> katılması durumunda ortamdaki patulinin 40 gün içerisinde % 50 oranında azaldığını, aynı miktar patulin içeren örneklere 200 ppm SO<sub>2</sub> ilavesi durumunda ise 10 günde yine % 50 oranında azalma saptandığını bildirmiştir (Woller und Majerus, 1982).

Ough and Corison (1980), 25 mg/l patulin içeren üzüm suyuna 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilmesinden 15 dakika sonra patulin miktarının 11,6±1,37 mg/l'ye düştüğünü saptadıklarını açıklamışlardır.

#### 4.2.2. 500 mg/l seviyesinde L-askorbik asit içeren elma suyunda üretim aşamalarında ve depolama süresinde patulin stabilitesi

L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 4.2.1'de belirtildiği gibi başlangıç seviyesi 6000 µg/l olacak şekilde hazırlanan patulinli elma ham suyu 3 kısma ayrılmış, birinci kısma hiçbirşey ilave edilmezken ikinci kısma 100 ppm SO<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Üçüncü kısma ise litreye 500 mg olacak şekilde L-askorbik asit katılmıştır. Bu şekilde hazırlanan L-askorbik asit içeren patulinli elma ham suyu diğer iki grupta olduğu gibi aynı şekilde elma suyu üretim aşamalarından geçirilmiş ve önce berrak elma suyu sonra elma suyu konsantresi ve elma suyu konsantresinden de tekrar elma suyu elde edilmiştir. Daha sonra Bölüm 4.2.1'deki gibi şişelere doldurulup ağzları taç kapakla kapatıldıktan sonra pastörize edilerek oda sıcaklığında 2 ve 4 ay süreyle depolanmışlardır.

Elma ham suyuna 500 mg/l L-askorbik asit ilave edildikten sonra patulin ve L-askorbik asit miktarları saptanmıştır. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi patulinli elma ham suyunda patulin miktarı 6000 µg/l olarak saptanırken, L-askorbik asit ilave edilmiş elma ham suyu örneğinde L-askorbik asit katılımından hemen sonra bu miktar % 33,4'lük bir azalma ile 6000 µg/l'den 4000 µg/l'ye inmiştir. L-askorbik asit miktarı ise 17,31±0,70 mg AA/100 ml olarak belirlenmiştir.

Enzimatik durultma ve berraklaştırma işleminden sonra elde edilen elma suyu örneklerinde patulin miktarlarındaki azalma daha da artmıştır. Bunun sonucunda L-askorbik asit içermeyen patulinli berrak elma suyunda patulin miktarı % 25'lik bir azalmayla 6000 µg/l'den 4500 µg/l'ye düşerken, L-askorbik asit ilave

edilen berrak elma suyu örneğinde patulin miktarı toplam % 50'lik bir azalmayla 4000  $\mu\text{g/l}$ 'den 3000  $\mu\text{g/l}$ 'ye düşmüştür.

Çizelge 4.9 : 6000  $\mu\text{g/l}$  patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen elma ham suyu örneklerinde L-askorbik asit ve patulin miktarları

Örnek	Patulin ( $\mu\text{g/l}$ )	L-askorbik asit (mg AA/100 ml)	Patulinde azalma (%)
Patulinli elma ham suyu	6000	—	—
Patulinli elma ham suyu + 500 mg L-askorbik asit/l	4000	17,31 $\pm$ 0,70	33,4

L-Askorbik asit miktarı ise 15,84 $\pm$ 0,10 mg AA/100 ml olarak belirlenmiştir. L-askorbik asit miktarındaki azalmanın L-askorbik asitin ortam koşullarından (ışık, oksijen gibi) olumsuz yönde etkilenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu arada berraklaştırmadan sonra her iki örnekte de kuru madde analizi yapılmış ve her ikisinde de % 12,5 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Bu şekilde elde edilen berrak elma suyu Rotary evaporatörde yukarıda açıklandığı şekilde konsantre edildikten sonra konsantrat tekrar kuru madde miktarı % 12,5 olacak şekilde saf su ile karıştırılarak rekonstitüye elma suyu örnekleri hazırlanmıştır.



Çizelge 4.10 : 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen berrak elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit ve kuru madde miktarları

Örnek	Patulin (µg/l)	L-askorbik asit (mg AA/100 ml)	Kuru madde (%)	Patulinde azalma (%)*	Patulinde azalma (%)**
Patulinli berrak elma suyu	4500	—	12,5	25	25
Patulinli berrak elma suyu + 500 mg L-askorbik asit/l	3000	15,84± 0,10	12,5	50	25

\* : Başlangıç 6000 µg/l patulin miktarına göre

\*\* : Sadece enzimatik durultma ve berraklaştırma işleminde görülen azalma

Çizelge 4.11'de de görüldüğü gibi bu örneklerde yapılan patulin analizleri sonucunda patulin değerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Patulinli elma suyunda patulin miktarı 4500 µg/l, L-askorbik asit katılmış elma suyu örneğinde ise 3000 µg/l olarak belirlenmiştir. Kuru madde değerleri ise yine her iki örnekte de % 12,5 olarak saptanmıştır.

L-askorbik asit miktarı ise 4,47±0,10 mg AA/100 ml olarak belirlenmiştir. L-askorbik asit miktarındaki bu azalmanın evaporasyon işlemi sırasında uygulanan ısı işleminden de kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.11 : 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen rekonstituye elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit ve kuru madde miktarları

Örnek	Patulin (µg/l)	L-askorbik asit (mg AA/100 ml)	Kuru madde (%)	HMF (mg/l)
Patulinli elma suyu	4500	—	12,5	*
Patulinli elma suyu + 500 mg L-askorbik asit/l	3000	4,47±0,10	12,5	*

\* : HMF saptanamamıştır.

100 ppm düzeyinde SO<sub>2</sub> ilave edilen elma suyu örneklerinde olduğu gibi 500 mg/l L-askorbik asit katılan elma suyu örneklerinde de patulin miktarında konsantrasyon sırasında bir azalma olmadığı görülmektedir. Patulin özellikle düşük pH değerlerinde ısıya karşı bir direnç göstermektedir. Pohland and Allen (1970) ve Lovett and Peeler (1973), patulinin 125 °C'da bile stabil olduğunu bildirmektedirler (Frank, 1980).

Diğer taraftan Scott and Somers (1968), meyve sularında 80 °C'da ve 90 °C'da patulin miktarında 10 ve 20 dakika sonunda önemli düzeyde azalmalar saptamışlardır (Woller und Majerus, 1982).

Rekonstituye elma suyu örnekleri koyu renkli şişelere 180 ml (yaklaşık 200 g) doldurulduktan sonra ağzları taç kapak ile kapatılarak kaynar su banyosunda 30 dakika pastörize edilmişlerdir. Pastörizasyon işlemini takiben şişeler mümkün

olduğunca kısa surede soğutulduktan sonra örneklerde kuru madde, patulin, HMF ve L-askorbik asit analizleri yapılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 : 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen, şişelenerek pastörize edilmiş elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit, HMF ve kuru madde miktarları

Örnek	Patulin (µg/l)	L-askorbik asit (mg AA/100 ml)	HMF (mg/l)	Kuru madde (%)
Patulinli elma suyu	4500	—	$0,63 \pm 1,2 \times 10^{-3}$	12,5
Patulinli elma suyu + 500 mg L-askorbik asit/l	3000	$3,46 \pm 0,05$	$0,52 \pm 2,6 \times 10^{-3}$	12,5

Çizelge 4.12'de de görüldüğü gibi pastörize edilmiş elma suyu örneklerinde de patulin miktarlarının aynı kaldığı görülmüştür. L-askorbik asit ilave edilmemiş elma suyu örneğinde patulin miktarı 4500 µg/l, L-askorbik asit içeren elma suyu örneğinde ise 3000 µg/l olarak sabit kalmıştır.

Bu arada örneklerde HMF analizi de yapılmış ve patulinli elma suyu örneğinde  $0,63 \pm 1,2 \times 10^{-3}$  mg/l, L-askorbik asit içeren patulinli elma suyu örneğinde ise  $0,52 \pm 2,6 \times 10^{-3}$  olarak belirlenmiştir.

Bu şekilde pastörize edilen elma suyu örnekleri, patulinin zaman içerisindeki stabilitesinin incelenmesi amacıyla karanlıkta ve oda sıcaklığında 4 ay süreyle depolanmışlar ve bu süre içerisinde örneklerde 2. ve 4. ay sonunda kuru madde,

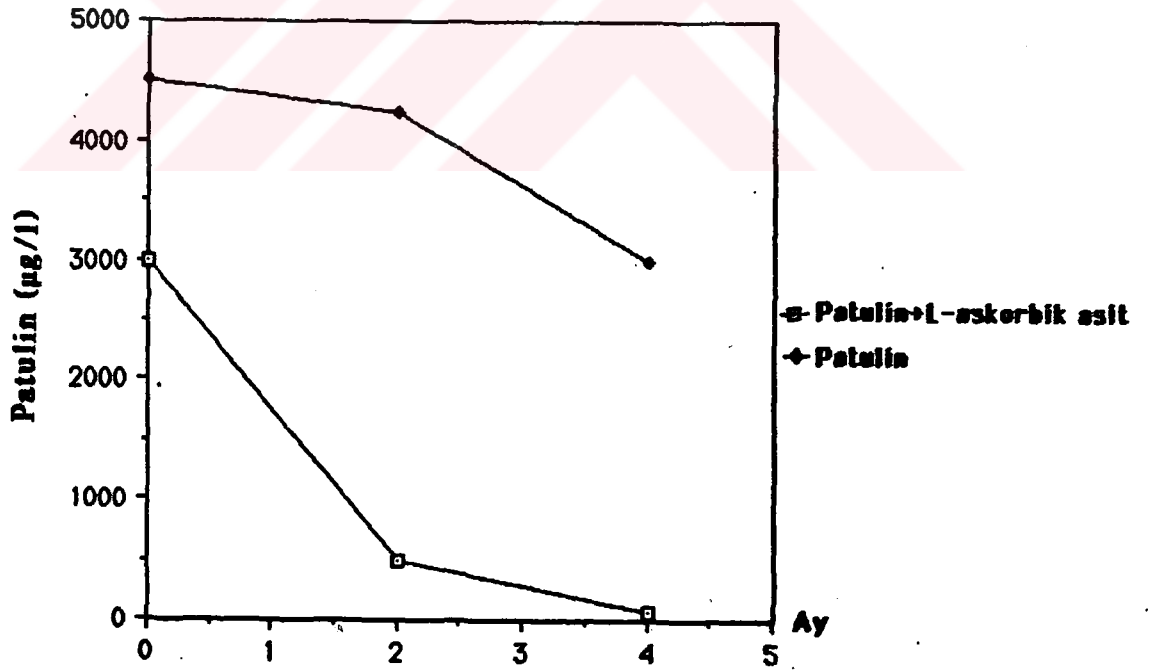
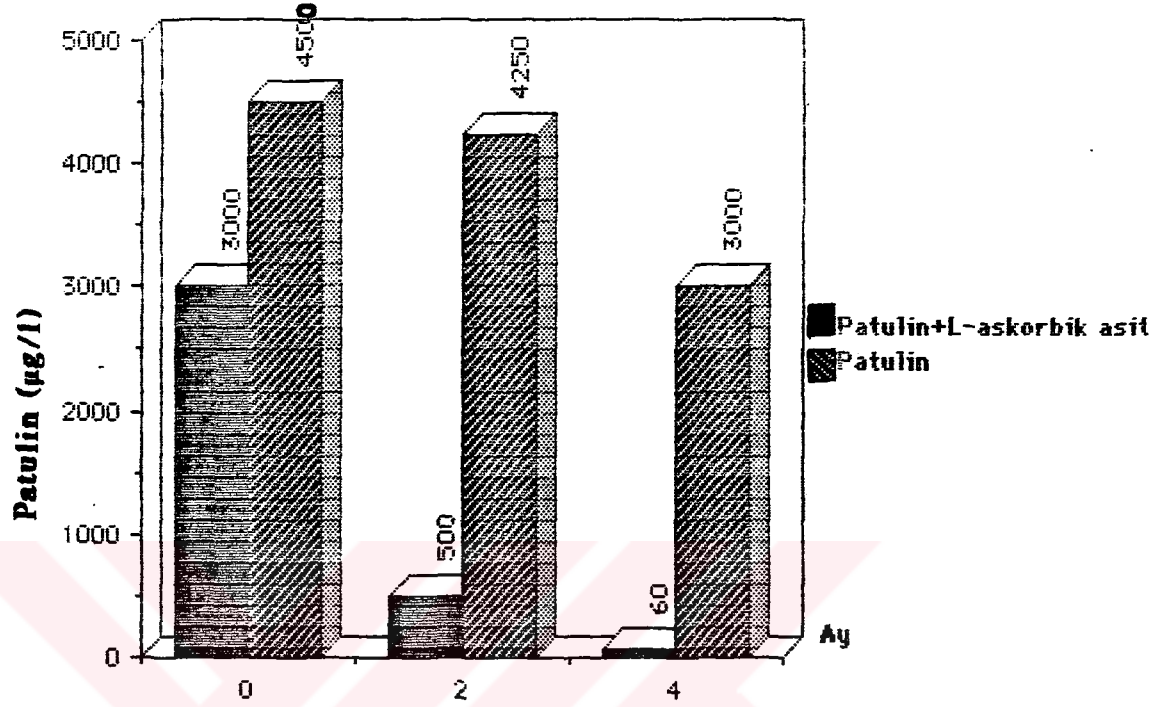
patulin, HMF ve L-askorbik asit analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.13'de verilmiştir. Ayrıca depolama süresine bağlı olarak patulin miktarında meydana gelen azalmalar da Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 : 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilen oda sıcaklığında 4 ay depolanan şeşelenmiş pastörize elma suyu örneklerinde patulin, L-askorbik asit, HMF ve kuru madde miktarları

Süre	Örnek	Patulin (µg/l)	L-askorbik asit (mg AA/100 ml)	HMF (mg/l)	Kuru madde (%)	Depolamada patulinde azalma (%)
2. Ay	Patulinli elma suyu	4250	—	1,26±0,03	12,6	5,6
	Patulinli elma suyu + 500 mg L-askorbik asit	500	0,11±0,04	1,91±0,03	12,6	83,4
4. Ay	Patulinli elma suyu	3000	—	2,23±0,10	12,6	33,4
	Patulinli elma suyu + 500 mg L-askorbik asit	60	*	2,18±0,02	12,6	98

\* : L-askorbik asit saptanamamıştır.

Çizelge 4.13'de de görüldüğü gibi depolama süresinin uzamasına bağlı olarak patulin miktarında önemli oranlarda azalmalar saptanmıştır. L-askorbik asit içermeyen patulinli elma suyu örneğinde 2. ay sonunda patulin miktarı 4500 µg/l'den 4250 µg/l'ye, başlangıç miktarı 6000 µg/l'ye göre % 29,1, depolama başlangıç miktarına göre ise % 5,6'lık bir azalma saptanmıştır. Buna karşılık



**Şekil 4.5 : 6000 µg/l patulin içeren ve 500 mg/l L-askorbik asit katılmış elma suyu örneğinde 4 aylık depolama aşamasında patulin miktarındaki azalmalar ile L-askorbik asit içermeyen elma suyunda patulin miktarındaki azalmalar.**

L-askorbik asit ilave edilmiş örnekte ise bu azalmalar 6000 µg/l'den 500 µg/l'ye % 91,7 ve depolama başlangıç değeri 3000 µg/l'ye göre % 83,4'lük bir azalma belirlenmiştir. Bu azalmalar 4. ay sonunda daha da artarak L-askorbik asit içermeyen patulinli elma suyu örneğinde başlangıç miktarına göre 6000 µg/l'den 3000 µg/l'ye % 50 oranında, depolama başlangıç değerine göre ise % 33,4 oranında bir azalma olmuştur. L-askorbik asit ilave edilen örnekte ise 4. ay sonundaki azalma başlangıç değeri 6000 µg/l'den 60 µg/l'ye % 99, depolama başlangıç değeri 3000 µg/l'den 60 µg/l'ye % 98 oranında gerçekleşmiştir.

L-askorbik asit miktarı 2. ay sonunda  $0,11 \pm 0,04$  mg AA/100 ml olarak tespit edilmiş, 4. ay sonunda ise elma suyu örneğinde L-askorbik asit saptanamamıştır.

HMF miktarı, L-askorbik asit içermeyen meyve suyu örneğinde 2. ay sonunda  $1,26 \pm 0,03$  mg/l, 4. ay sonunda  $2,23 \pm 0,10$  mg/l, L-askorbik asit içeren elma suyu örneğinde ise sırasıyla  $1,91 \pm 0,30$  mg/l ve 4. ay sonunda da  $2,18 \pm 0,02$  mg/l olarak belirlenmiştir. Örneklerin kuru madde değerleri ise % 12,6 olarak saptanmıştır.

Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada Brackett and Marth (1979 a), 300 µg/l patulin içeren elma suyuna % 5 oranında C vitamini eklenmesi sonucu 8 günde patulinin yaklaşık % 90'nın parçalandığını açıklamışlardır.

Acar ve Arsan (1988), 500 mg/l L-askorbik asit ilave edilmiş, 1000 µg/l patulin içeren elma suyu örneklerinde 6 aylık bir depolama sonunda patulin saptanamadığını, aynı şekilde hazırlanan şeftali nektarında ise 6. ay sonunda patulinin 50 µg/l'ye düştüğünü bildirmişlerdir.

Örneklerde tüm işlem aşamalarının ve uygulamaların etkileri incelenecek olursa, Çizelge (4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13) ve Şekil

(4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5)'de görüldüğü gibi elma suyu üretim aşamalarında patulin stabilitesine en önemli etkinin enzimatik durultma ve berraklaştırma aşamasında olduğu görülmüştür. Çalışmada her üç grup ham elma suyu örneğinde de enzimatik durultma ve berraklaştırma işlemi sonunda patulin miktarlarında yaklaşık % 25 gibi oldukça önemli bir oranda azalma saptanmıştır.

Acar ve Arsan (1988), bu konuda yaptıkları bir çalışmada 900 µg/l ve 700 µg/l patulin içeren elma ham suyunda enzimatik durultma ve berraklaştırma sonrasında patulin miktarlarının sırasıyla 350 µg/l ve 150 µg/l'ye düştüğünü belirtmişlerdir.

Kaynar su banyosunda 30 dakika süre ile uygulanan pastörizasyon işlemi sonunda ise gruplardaki elma suyu örneklerinin yani SO<sub>2</sub>, L-askorbik asit içeren örneklerin hiçbirisinde patulin miktarında azalma saptanamamıştır. Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır.

Lovett and Peeler (1973), pH değeri 3,5 olan ve 100-150 µg/l patulin içeren sulu çözeltinin 25 °C'da 268 dakika tutulması sonucunda patulinin % 90 düzeyinde azaldığını bildirmiştir.

Wheeler et al. (1987), farklı sıcaklık ve sürelerdeki pastörizasyon uygulamaları sonucunda patulin stabilitesini araştırmışlar ve sonuçta 70 °C'da 10 saniye süreyle pastörize edilen elma ciderındaki patulinin azalma oranını % 7, 60 °C'da ve 10 saniyede % 12, 80 °C'da ve 10 saniyede % 19, 90 °C'da ve 10 dakikada % 15 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Acar ve Arsan (1988), laboratuvar koşullarında elde edilen, hiçbirşey ilave edilmemiş elma suyu örneğindeki patulin miktarınının, kaynar su banyosunda 20 dakika süre ile pastörize edilmesi sonucunda değişmediğini açıklamışlardır.

Buna karşılık L-askorbik asit ilave edilen örneklerde pastörizasyonun patulin miktarını % 33,3 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Ayrıca aynı şekilde yapılan ve 500 mg/l L-askorbik asit içeren ve içermeyen şeftali nektarı örneklerinde de patulin miktarında pastörizasyon işlemi sonunda herhangi bir azalma saptanmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda patulin miktarındaki azalmalar özellikle depolama aşamasında ortaya çıkmış ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak patulin miktarında önemli oranlarda azalmalar gözlenmiştir.

Analiz sonuçlarından da görüldüğü gibi hem SO<sub>2</sub> hem de L-askorbik asit elma suyundaki patulin stabilitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Ancak bu maddelerin patulin ile reaksiyona girdikten sonra oluşan yeni ürünler ve bunların toksisitesi konusunda yeterli çalışmalar henüz yapılmadığından ve bu konu çalışmanın çerçevesi dışında olduğundan bu yöntemin patulin içeren elma sularında uygulanması önerilememektedir.

#### 4.3. Uzum Suyunda Patulin Stabilitesinin İncelenmesi

Çalışmada üzüm suyunda patulin stabilitesinin incelenmesi amacıyla piyasadan sağlanan sağlam üzümlerin tanelerinin herbiri salkım üzerinde iken *Penicillium expansum* ile aşılansak 27 °C'da 7 gün süre ile inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda küflenen üzümlerden ön deneme için üzüm suyu elde edilmiş ve yapılan patulin analizi sonucunda patulin miktarı yaklaşık 1200 µg/l olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu süre zarfında üzümlerde yüzey mikrofloralarındaki mayaların etkisiyle alkol fermentasyonu da başladığından üzümler meyve suyuna işlenemeyecek bir hal almışlardır. İnkübasyona devam



edildiğinde en fazla 2000 µg/l düzeyinde patulin saptanmış ancak üzümler tamamen bozulmuştur.

Böylece patulin oluşumu için aşılınmış üzümler fermente olduklarından üzüm suyuna işleme niteliğinde olmadıkları gibi, yüzeyinde doğal olarak bulunan mayalar nedeniyle alkol fermentasyonu sonucu küfler tarafından oluşturulan patulin de parçalanmış ve küflenmiş üzümlerde, çalışmada önceden belirlenmiş oranda yani 6000 µg/l seviyesinde patulin de saptanmıştır.

Harwig et al. (1973 a)'da *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces cerevisiae* Y-99 ve *S.cerevisiae* MAC Y2947 suşu ile aşılanan ve 25 °C'da 2 hafta süre ile fermente edilen elma suları örneklerinde süre sonunda çok az veya tespit edilemez miktarda patulin olduğunu bildirmişlerdir.

Burroughs (1977), iki farklı *Saccharomyces cerevisiae* suşu ile sentetik ortamda gerçekleştirdiği 3 günlük fermentasyon sonunda patulinin ancak % 8-10'nun geri tayin edilebildiğini belirtmiştir.

Stinson et al. (1978), 15 mg/l patulin içeren elma sularının mayalar tarafından 23-25 °C'da ve 10-14 gün süreyle fermente edilmesi sonucunda ortamdaki patulinin % 99'nun parçalandığını saptamışlardır.

Ough and Corison (1980), 25 mg/l patulin içeren üzüm sularında *Saccharomyces cerevisiae* U.C.D 522 suşunun 15 °C'da gerçekleştirdiği fermentasyon sonucunda patulin miktarının 0,112±0,018 mg/l olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Altmayer et al. (1982), üzüm şirasının 100 mg potasyum piroşulfit/l seviyesinde kökürtlenmesi ve *Saccharomyces* cinsi mayalar tarafından fermente edilmesi

ile ortamdaki patulinin azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu reaksiyonun oda sıcaklığında ve birkaç haftada gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak *P.expansum* ile aşılanan üzümelerde patulin oluşumu için uygulanan inkübasyon sonucunda fermentasyonun etkisiyle başlangıç değeri olarak saptanan 5000-6000 µg/l düzeyinde patulin oluşturulmadığı gibi fermentasyona uğramış üzümler de üzüm suyu üretimi için uygun özellik göstermediklerinden denemelere devam edilememiştir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada SO<sub>2</sub> ve L-askorbik asit ilave edilmiş, pH değeri 3.96 olan McIlvaine tampon çözeltisi ile laboratuvar koşullarında hazırlanmış elma suyu örneklerinde patulin stabilitesi incelenmiştir. Daha sonra tampon çözeltide patulin, SO<sub>2</sub> ve L-askorbik asit, elma suyu örneklerinde ise patulin, SO<sub>2</sub>, L-askorbik asit ve kuru madde analizleri yapılmıştır.

Bütün örneklerle ilişkin olarak elde edilen araştırma sonuçları aşağıda verilmiştir:

a) Tampon çözeltide L-askorbik asitin patulin stabilitesine etkisinin SO<sub>2</sub>'den daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca SO<sub>2</sub>'in etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu ve konsantrasyonun artması sonucunda buna bağlı olarak patulin miktarındaki azalmalar da artmıştır.

b) Kükürtlü ve L-askorbik asit ilave edilmiş tampon çözeltilerde sürenin uzaması ile patulin miktarının azaldığı saptanmıştır.

c) Elma suyu üretim aşamalarında, patulin miktarındaki en fazla azalma enzimatik durultma ve berraklaştırma aşamasında olmuştur. Buna karşılık konsantrasyon ve pastörizasyon işlemleri patulin miktarında herhangi bir azalmaya neden olmamıştır.

d) Elma sularının depolanmaları sırasında depolama süresinin uzaması ile birlikte patulin miktarında da önemli oranlarda azalmalar olmuş ve bu azalma oranları kükürtlü örneklerle karşılaştırıldığında L-askorbik asit içeren elma sularında daha fazla olmuştur.

e) Üzüm sularında patulin oluşumu ile birlikte aynı zamanda üzümlerde doğal olarak bulunan mayaların neden olduğu alkol fermentasyonu sonucunda, denemede önceden belirlenen miktarda patulin oluşumu sağlanamamıştır ve üzümler meyve suyuna işlenemeyecek şekilde fermente olmuşlardır.



**KAYNAKLAR**

- 62
- Acar, J. und Klaushofer, H., 1984, Vorkommen und Nachweis von Patulin in handelsüblichen Tomatenpasten: Ernährung, Nutrition, 8/6, 323-326
- Acar, J. ve Arsan, B.T., 1988, Meyve sularında patulin oluşumu üzerine araştırmalar : TÜBİTAK, Proje no : TOAG-554, Basılmamış, Ankara.
- Altmayer, B., Eichhorn, K.W. und Plapp, R., 1982, Untersuchungen über den Patulingehalt von Traubenmosten und Wein: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 175, 172-174.
- Anonymous, 1951, Ascorbic acid : Methods of vitamin assay, 2. Ed. Interscience Publishers. Inc. New York.
- Anonymous, 1974, Encyclopedia of industrial chemical analysis : Ed. by Foster Dee Sneeel and Leslie S. Ettre, John Wiley and Sons. London.
- Anonymous, 1981, T.S.E., Elma suyu (TS-3633) : Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonymous, 1986, Mycotoxins and food safety : Food Tech. May, 59-66.
- Aping, R., 1982, Die Patulinbildung durch *Penicillium expansum* in Äpfeln und in Apfelsäften in Abhängigkeit von der Sorte, dem Standort und der Düngeung im Vergleich zu relevanten Fruchtmerkmalen (Dissertation), Giessen (Basılmamış).

Brackett, R.E and Marth, E.H., 1979 a. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice : J. Food Prot., 42, 11, 864-866.

Brackett, R.E and Marth., 1979 b, Stability of patulin at pH 6,0-8,0 and 25 °C : Z. Lebensm. Unters. Forsch., 169, 92-94.

Bullerman, L.B., 1983, Inhibition of patulin by potassium sorbate : J. Food Prot., 46, 928.

Bullerman, L.B., Schroeder, L.L. and Park, K.Y., 1984, Formation and control of mycotoxins in food : J. Food Prot., 47, 8, 637-646.

Bullerman, L.B., 1985, Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production : Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 18, 3, 197-200.

Burroughs, L.F., 1977, Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation : J. AOAC, 60, 1, 100-103.

Can, A.G. ve Ekşi, A., 1983, Meyve suyunda hidroksimetilfurfural (HMF) oranı üzerine araştırma : Gıda, 2, 51-54.

Cemeroglu, B., 1982, Meyve suyu üretim teknolojisi : Teknik Basım Sanayii Matbaası, Kızılay, Ankara, 309 s.

Cemeroglu, B. ve Acar, J., 1986, Meyve ve sebze işleme teknolojisi : Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın no: 6, 508 s.

- Ceritoglu, A., 1978, Gıda maddelerinde vitamin tayini yöntemleri üzerinde bir çalışma : TÜBİTAK Beslenme ve Gıda Tek. Ünít., Proje no: 0500027703/Yay. no: 34, 53-68.
- Ciegler, A., Beckwith, A.C. and Jackson, L.K., 1976, Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine : Appl. Environ. Microbiol. 31, 664-667.
- Damoglou, A.P., Campbell, D.S. and Button, J.E., 1985, Some factors governing the production of patulin in apples : Food Microbiology 2, 3-10.
- Damoglou, A.P. and Campbell, D.S., 1986, The effect of pH on the production of patulin in apple juice : Letters in Appl. Microbiology., 2, 9-11.
- Draughon, A.F. and Ayres, J.C., 1979, Insecticide inhibition of growth and patulin production by *Penicillium urticae*: J. Food Sci., 44, 1232-1234.
- El-Banna, A.A., Pitt, J.I. and Leistner, L., 1987, Production of mycotoxins by *Penicillium* species : System. Appl. Microbiol., 10, 42-46.
- Frank, H.K., Orth, R. und Figge, A., 1977, Patulin in Lebensmittel pflanzlicher Herkunft 2. verschiedene Obstarten, Gemüse und daraus hergestellte Produkte : Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163, 111-114.
- Frank, H.K., 1980, Patulin in Produkten pflanzlicher Herkunft : Confructa, 25, 3/4, 107-118.

Harwig, J., Scott, P.M., Kennedy, B.P.C. and Chen, Y.K., 1973 a, Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. : J. Inst. Can. Sci., Technol. Aliment. 6,1, 45-46.

Harwig, J., Chen, Y.K., Kennedy, B.P.C. and Scott, P.M., 1973 b, Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada : J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 6, 1, 22-25.

Harwig, J., Blanchfield, B.J. and Jarvis, G., 1977, Effect of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grains : J. Food Sci., 42, 5, 1225-1228.

İnce, H., 1978, Bazı meyve sularında patulin stabilitesini etkileyen faktörler üzerinde araştırmalar : İhtisas tezi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ankara, 57 s. (yayınlanmamış).

Josefsson, E. and Andersson, A., 1977, Analysis of patulin in apple beverages sold in Sweden : Extrait des "Archives de Institut Pasteur de Tunis". 3-4, 261-268.

Koch, E.C., Thurm, V. und Paul, P., 1979, Zur hygienischen Bedeutung von Patulin in Lebensmittel : 1. Mitt. Zum analytischen Nachweis von Patulin, Die Nahrung 23/2, 125-130.

Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R. and Marzin, D., 1987, Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid medium : J. Microbiol. Meth., 7, 29-36.



Lindroth, S., Niskanen, A. and Pensala, O., 1978, Patulin production during storage of blackcurrant, blueberry and strawberry jams inoculated with *Penicillium expansum* mould : J. Food Sci., 43, 5, 1427-1429, 1432.

Lindroth, S. and Niskanen, A., 1978, Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products : J. Food Sci., 43, 446-448.

Lindroth, S., 1980, Occurrence, formation and detoxification of patulin mycotoxin : Academic Dissertation, Espoo, Finland, 46 p.

Lovett, J. and Peeler, J.T. 1973, Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution : J. Food Sci., 38, 1094-1095.

Meyer, R.A., 1982, Zur Bestimmung von Patulin in Lebensmitteln-Vorschlag einer Standardmethode. Nahrung, 26/4, 336-342.

Mortimer, D.N., Parker, I., Shepherd, M.J. and Gilbert, J., 1985, A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin : Food Additives and Contaminants, 2, 3, 165-170.

Norstadt, F.A. and Mc Calla, T.M., 1969, Patulin production by *Penicillium urticae* Bainier in batch culture : Appl. Microbiol., 17, 2, 193-196.

Northolt, M.D., Van Egmond, H.P. and Paulsch, W.E., 1978, Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature : J. Food Prot., 41, 11, 885-890.

Northolt, D.M. and Bullerman, L.B., 1982, Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions : J. Food Prot., 45, 6, 519-526.

Ough, C.S. and Corison, C.A., 1980, Measurement of patulin in grapes and wines : J. Food Sci., 45, 3, 476-478.

Özçelik, S., 1980, Nigde, Amasya ve Erzincan illerinde uretilen önemli elma çeşitlerinde mikrobiyal bozulmalar ve bozulan elmalardan patulin oluşumu : TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi, TOAG Tebliğleri (Gıda ve Fermentasyon Teknolojisi Sektörünü) 6-10 Ekim 1980-Adana, (1-15).

Özçelik, S., 1982, Patulin üretimine etki eden faktörler : Gıda, 7, 2, 49-54.

Pearson, D., 1971, The chemical analysis of foods : 6 th ed., Chemical Publishing Co., Inc., NY, 604 p.

Pohland, A.E. and Allen, R., 1970, Stability studies with patulin : J. AOAC, 53, 4, 688-691.

Rauscher, K., Voight, J., Wilke, I. und Wilke, K.T., 1972, Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis : VEB Deutscher Verlag Für Grundstoffindustrie, Leipzig, 337 p.

Ray, L.L. and Bullerman, L.B., 1982, Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents : J. Food Prot., 45, 10, 953-963.

Rice, S.L., Beuchat, L.R. and Worthington, R.E., 1977, Patulin production by *Byssochlamys* spp. in fruit juices : Appl. Environ. Microbiol., 34, 6, 791-796.

- Roland, J.O., Beuchat, L.R., Worthington, R.E. and Hitchcock, H.L., 1984, Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in grape juice : J. Food Prot., 47, 3, 237-241.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Corchot, C.A., 1981, Introduction to food-borne fungi : Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Holand, 247 p.
- Schobinger, H., 1987, Frucht-und Gemüsesäfte : Handbuch der Lebensmitteltechnologie, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Scott, P.M. and Somers, E., 1968, Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour : J. Agr. Food Chem., 16, 483-485.
- Scott, P.M., 1978, Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin : J. Food Prot., 41, 5, 385-398.
- Scott, P.M., 1984, Effects of food processing on mycotoxins : J. Food Prot., 47, 6, 489-499.
- Smith, J.E. and Moss, M.O., 1985, Mycotoxins formation, analysis and significance : John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 148 p.
- Sommer, N.F., Buchanan, J.R. and Fortlage, R.J., 1974, Production of patulin by *Penicillium expansum* : Appl. Microbiol., 28, 4, 589-592.
- Stinson, E.E., Osman, S.F., Nuthanen, C.N. and Bills, D.D., 1978, Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice : Appl. Environ. Microbiol., 36, 4, 620-622.

Torres, M., Canela, R., Riba, M. and Sanchis, V., 1987, Production of patulin and griseofulvin by a strain of *Penicillium griseofulvum* in three different media : *Mycopathologia*, 99, 85-89.

Wheeler, J.L., Harrison, M.A. and Koehler, P.E., 1987, Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider : *J. Food Sci.*, 52, 2, 479-480.

Wilson, D.M. and Nuovo, G.J., 1973, Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum* : *Appl. Microbiol.*, 26, 1, 124-125.

Woller, R. und Majerus, P., 1982, Patulin in Obst und Obsterzeugnissen Eigenschaften, Bildung und Vorkommen : *Flüssiges Obst*, 10, 564-570.

W. G.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkez