

T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SÜRDÜRÜLEBİLİR TARIM VE TABİİ BİTKİ KAYNAKLARI
ANA BİLİM DALI



ELMA, ELMA SİRKESİ, ELMA SUYU VE
KONSANTRELERİNDE PATULİN DÜZEYLERİNİN
İNCELENMESİ

OSMAN GÖKÇE ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ NESRİN İÇLİ

OCAK - 2022
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Osman Gökçe ÖZER tarafından hazırlanan “**ELMA, ELMA SİRKESİ, ELMA SUYU VE KONSANTRELERİNDE PATULİN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **18.01.2022** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Sürdürülebilir Tarım ve Tabii Bitki Kaynakları Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Nesrin İÇLİ Kastamonu Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doçent Dr. Hilal YILDIZ Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fatma Yağmur HAZAR Kastamonu Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İzzet ŞENER

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Osman Gökçe ÖZER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELMA, ELMA SİRKESİ, ELMA SUYU VE KONSANTRELERİNDE PATULİN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

OSMAN GÖKÇE ÖZER

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SÜRDÜRÜLEBİLİR TARIM VE TABİİ BİTKİ KAYNAKLARI ANA BİLİM
DALI
DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ NESRİN İÇLİ

Penicillium expansum gibi bazı küf mantarı türleri tarafından üretilen ve toksisite, mutajenite ve immünotoksisite gibi olumsuz etkileri bulunan Patulin (PAT), toksik bir ikincil metabolittir. PAT üreten küf mantarları elma üzerinde çürümeye neden olarak PAT kontaminasyonuna neden olarak elma suyu ve elma suyu konsantresi gibi elma ürünlerinde de PAT kalıntılarının bulunabilmesine sebebiyet vermektedir. Bu tez çalışmasında amaç elma, elma suyu, elma suyu konsantresi ve elma sirkelerinde ciddi toksik etkilere sahip PAT kontaminasyonu düzeylerini belirlemektir. Ayrıca, bu tez çalışmasında elmalarda depolama süresi boyunca PAT kontaminasyonu değişimi de incelenmiştir. Toplam 78 adet numune, sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılarak etil asetat ile ekstrakte edilmiş ve PAT seviyeleri diyot dizi dedektörüne (DAD) sahip bir Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile belirlenmiştir. Çalışmamızda en yüksek PAT kontaminasyonuna depolamanın 3. ayında alınan bir çürük elma numunesinde (36,496 µg/kg) rastlanmış olup tüm numunelerin ortalama PAT konsantrasyonu 1.240,246 µg/kg olarak bulunmuştur. Elma suları numunelerinin hiçbirinin PAT düzeyi yasal limiti (50 µg/L) aşmamıştır. Ancak elma suyu konsantresi numunelerinden ikisinin PAT düzeyi bu limitin üzerinde çıkmıştır. 4 ev yapımı elma sirkesi numunesinin ise 50 µg/L'nin üstünde PAT içerdiği belirlenmiştir. Soğuk hava depolarında depolanan elmalarda ortamda sürekli olarak bulunan PAT üreten küflerin kontaminasyonunun önüne geçilemediği, depolama süresi arttıkça ortamdaki kontaminasyonun artması nedeniyle elmalardaki PAT düzeylerinin de arttığı da tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları PAT kontaminasyonunun elma ve ürünleri için ülkemizde hala sorun teşkil ettiğini ve evsel ve ticari üretim koşullarına dikkat edilmez ise PAT kontaminasyonunun yasal limitleri aşarak sağlığı tehdit edecek düzeylere ulaşabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Patulin, Elma, HPLC, Toksisite, Gıda güvenliği

Ocak 2022, 38 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF PAT LEVELS IN APPLE, APPLE VINEGAR, APPLE JUICE AND CONCENTRATES

OSMAN GÖKÇE ÖZER

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF SUSTAINABLE AGRICULTURE AND NATURAL
PLANT RESOURCES

SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. NESRİN İÇLİ

Patulin (PAT) is a toxic secondary metabolite produced by some mold species such as *Penicillium expansum* and has adverse effects such as toxicity, mutagenicity and immunotoxicity. *Mold* fungi that produce PAT (PAT) cause rot and contamination in apples. This cause PAT residues to be found in apple products such as apple juice and apple juice concentrate. The aim of this thesis study is to determine the PAT contamination levels, which have serious toxic effects, in apple, apple juice, apple juice concentrate and apple cider vinegar. In addition, the variation of PAT contamination in apples during storage was also investigated in this thesis. A total of 78 samples were extracted with ethyl acetate using the liquid-liquid extraction technique and PAT levels were determined with a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument with diode array detector (DAD). In our study, the highest PAT contamination was found in a rotten apple sample (36.496 µg/kg) taken at the 3rd month of storage, and the average PAT concentration of all samples was found to be 1,240,246 µg/kg. The PAT level of none of the apple juice samples exceeded the legal limit (50 µg/L). However, the PAT level of two of the apple juice concentrate samples was above this limit. It was determined that 4 homemade apple cider vinegar samples contained PAT over 50 µg/L. It has also been determined that the contamination of PAT-producing molds that are constantly present in the environment of apples stored in cold storage cannot be prevented, and the PAT levels in apples increase due to the increase in the contamination in the environment as the storage period increases. The results of our study showed that PAT contamination still poses a problem for apples and its products in our country, and if domestic and commercial production conditions are not taken into account, PAT contamination can exceed legal limits and reach levels that threaten health.

KEYWORDS: Patulin, Apple, HPLC, Toxicity, Food safety

January 2022, 38 Page

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütölmesi sürecinde, yoğun çalışma takvimi olmasına rağmen emeğini ve ilgisini hiç eksik etmeyen danıőmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nesrin İÇLİ'ye, çalışmaya KÜ-BAP03/2020-6 projesi ile yardımcı olan Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, laboratuvar analizlerinde her türlü imkân ve yardımıyla çalışmaya destek olan Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi Öğr. Gör. Sayın Fevziye Iőtıl KESBİÇ'e ve çalışmaya katkıları olan diğer hocalarıma teşekkür ederim.

Numune toplama aşamalarında yardımlarını esirgemeyen bütün üreticilere, firmalara ve kiőtilere ayrıca teşekkür ederim.

Çalışma sürecim boyunca beni yalnız bırakmayan, enerjisi ve neőesiyle bana motivasyon ve ilham veren kızım Efna Nazlı ÖZER'e ve sevgili eőtım Yeliz ÖZER'e ve desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen değerli aileme sonsuz sevgilerimi ve teőekkürlerimi sunarım.

OSMAN GÖKÇE ÖZER

Kastamonu, 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Mikotoksinler	1
1.2 Patulin (PAT)	2
1.2.1 PAT Toksisitesi.....	3
1.2.2 PAT İle İlgili Mevzuatlar.....	4
1.2.3 PAT Giderim Yöntemleri	5
1.3 Çalışmanın Amacı	7
2. LİTERATÜR ÖZETİ	8
2.1 Türkiye’de Elma ve Elma Ürünlerinde PAT Düzeylerini İnceleyen Çalışmalar	8
2.2 Dünyada Elma ve Elma Ürünlerinde PAT Düzeylerini İnceleyen Çalışmalar	10
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1 Materyal.....	14
3.2 Materyal Temini	14
3.3 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	14
3.4 Kullanılan Araçlar	15
3.5 Metot	15
3.5.1 Numunelerden PAT Ekstraksiyonu	16
3.5.2 PAT Analizi	20
3.6 Metot Validasyonu	21
3.7 İstatistikî Analiz	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 pH ölçümlerinin yapıldığı milwaukee marka pH ölçüm cihazı	16
Şekil 3.2 Sartorius CPA225D Hassas Terazi (Göttingen, Almanya).....	17
Şekil 3.3 Fazların birbirinden ayrılması.....	18
Şekil 3.4 Numunenin kağıt süzgeçten cam tüplere süzülmesi	19
Şekil 3.5 PAT kalibrasyon grafiği.....	21
Şekil 4.1 32 nolu yarı çürük elma numunesinin PAT kromatogramı	23



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1 Numunelere uygulanan PAT, pH ve Briks analiz sonuçları	24
Tablo 4.2 Tüm numunelere ait tanımlayıcı istatistikler	26
Tablo 4.3 Elma ve elma suyu gruplarının analiz sonuçlarının ortalama değerlerinin istatistiki olarak karşılaştırılması	28
Tablo 4.4 Elma ve elma suyu gruplarının analiz sonuçlarının arasında istatistiki anlamlı bir ilişki olup olmadığının incelenmesi	29
Tablo 4.5 Sirke numunelerine ait tanımlayıcı istatistikler	29
Tablo 4.6 Elma sirkesi numunelerinin analiz sonuçlarının arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının istatistiki incelenmesi	30
Tablo 4.7 Elma suyu konsantresi numunelerine ait tanımlayıcı istatistikler	30
Tablo 4.8 Elma suyu konsantresi numunelerinin analiz sonuçlarının arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının istatistiki incelenmesi	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
µg	: Mikrogram
°C	: Santigrat Derece
pH	: Çözeltinin asitlik ya da bazlık derecesini ifade eden ölçü birimi
Brix	: Sulu bir çözeltideki çözünmüş şeker derecesidir
Se	: Selenyum
-SH	: Sülfidril fonksiyonel grubu
-NH₂	: Amin fonksiyonel grubu
-OH	: Hidroksil fonksiyonel grubu

Kısaltmalar

FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
PAT	: PAT
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HMF	: Hidroksimetil Furfural
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

1.1 Mikotoksinler

İnsanlar antik çağlardan beri peynir, ekmek, salam, bira ve şarap yapımında küf ve mayalardan faydalanmaktadır. Gıda üretimi ile birlikte görülen gizemli hastalıklar ilk mevzuat çalışmalarına ve gıda kalitesinin denetlenmesine yol açmıştır. Literatüre göre bilinen en eski mevzuatların Babilliler ve Hititler tarafından ilan edildiği açıklanmıştır. Her iki tarihi mevzuat da modern gıda yasalarımızdan sağlığın korunması ve sahtekârlığın önüne geçmek gibi iki önemli hedefle ilgilenmiştir. Gıda ve sağlık güvenliğine dayanarak tüketiciler, makamlar ve bilim toplulukları küflerle ilgili sağlık riskleriyle giderek daha fazla ilgilenmeye başlamışlardır. Gıdaların mikroskopik mantarlar tarafından istila edilmesi ve toksinlerin gıda zincirinde birikmesi ile insanoğlu gıda ve biyolojik sıvılardaki mikotoksin analizlerine odaklanmıştır. Küf ve diğer mikroorganizmaların büyümeleri için gerekli olan metabolitler, birincil metabolit olarak adlandırılmıştır. Uçucu organik maddeler ve mikotoksinler ise ikincil metabolitler olarak sentezlenmektedir. Küfün logaritmik gelişim evresinin sonunda üreilmeye başlanan ikincil metabolitlerin, küfün gelişimi üzerinde önemli bir etkisi bulunmamaktadır. Mikotoksinler, tarlada veya hasat sonrasında ekinleri kolonize eden belirli filamentli mantarlar tarafından üretilen, düşük uçuculuğa sahip, düşük moleküler ağırlıklı toksik kimyasal bileşiklerdir. Elverişsiz hasat, kurutma, taşıma, paketlenme, depolama ve dağıtım tesisleri, mikotoksinlerin yoğunlaşmasına sebep olan etmenlerden bazılarıdır (Mahato vd. 2021). Farklı kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösteren mikotoksinler büyük bir yapısal çeşitlilik göstermektedir. 500'den fazla farklı mikotoksin bulunmakta olup genel olarak mikotoksinler kimyasal ve termal olarak kararlı bileşiklerdir. Bu maddeler genellikle üretim ve gıda işleme aşamalarında yüksek sıcaklıklarda çok kararlı olabilmektedir (Iqbal, 2021). Mikotoksinler depolamada ve tahıl üretim proseslerinin çoğunda hayatta kalabilmektedirler (Köppen vd. 2010). İnsan gıdalarında ve hayvan yemlerinde mikotoksinler gibi toksik bileşiklerin bulunması dünya çapında önemli bir konu olup insanlar ve hayvanlar için risk olarak kabul edilmektedir. Mikotoksinlerin gıdalardaki varlıkları gıdaların kalitesini ve güvenliğini etkilemekte ve böylece önemli ekonomik

kayıplara neden olmaktadır. Mikotoksinin kelime anlamı, “mantar/küf ve zehir” anlamına gelen Yunanca “*mykes*” ve “*toxicum*” terimlerinden gelmektedir. Bu toksinlerin oluşumu, nem içeriği, sıcaklık, gıda maddesinin bileşenleri ve havadaki su buharının varlığı gibi belirli koşullar altında gerçekleşmektedir. Mikotoksinler, kontamine gıdaların doğrudan tüketilmesi veya bitkilerden elde edilen yiyeceklerin kullanılması veya dolaylı olarak yumurta, et ve süt gibi hayvansal kaynaktan elde edilen yiyeceklerin tüketilmesi yoluyla insan vücuduna girmektedirler. Mikotoksinler çok az miktarda bulunsalar bile insan vücudu üzerinde zararlı etkiler gösterebilmekte ve insanlar veya hayvanlar üzerinde genom ekspresyonu değişikliklerine, böbrek hastalıklarına, üreme sistemi bozukluklarına, bağırsak yolunda rahatsızlıklara ve vücutta kansere neden olan hücresel değişikliklerin gelişebilmesine sebep olabilmektedir (Değirmen, 2020).

1.2 Patulin (PAT)

PAT (4-hidroksi-4H-furo [3,2]-piran-2 [6H]-on) (PAT), *Byssoschlamys*, *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi belirli küf mantarı türleri tarafından üretilen en önemli mikotoksinlerden biridir. Ancak üretimi bu türlerle sınırlı kalmamaktadır. Bu da kontaminasyondan sorumlu mantarın tanımlanmasında bazı zorluklar yaratmaktadır. Düşük sıcaklıklardaki ortamlarda PAT esas olarak *Penicillium* türleri tarafından üretilirken, daha sıcak ve nemli bölgelerde (tropikal ve subtropikal) genellikle *Aspergillus* türleri tarafından üretilmektedir (Cunha vd. 2014). PAT üreten bu küfler arasında, elma ve diğer meyvelerin de ortak kirleticisi olan *Penicillium expansum* en önemlisidir. *P. expansum* depolarda bulunan elmalarda görülen mavi küf çürüğü etkeni olarak tanımlanır. *P. expansum* genellikle sağlıklı meyvelerin yüzeylerinde gelişmektedir. Ancak normalde meyve bahçelerinde ve yaygın olarak hasat sonrası koşullar altında diğer mikroorganizmalar tarafından zaten enfekte olmuş meyve veya meyvelerle ilişkilidir (Marín vd. 2011). *Penicillium expansum*'un büyüme ve gelişmesi için optimum sıcaklık değeri 25 °C olarak tespit edilirken, donma noktasına yakın sıcaklık değerlerinde de aktif olarak faaliyet gösterebildiği, bu yüzden elmaların kısa veya uzun süreli depolanması sırasında bozulmalarına sebep olduğu bildirilmiştir (Clercq vd. 2016). PAT'ın sıklıkla meyve ve meyve ürünlerinde oluşmasının nedeni bu gıdaların bünyelerinde meyve şekeri olarak bilinen früktozun daha fazla bulunması

ile açıklanabilir. PAT oluşumunda en etkili şekerin früktoz ve sonrasında glikoz olduğu bildirilmiştir (Oskay, 2012).

1940'lı yıllarda PAT, *Mycobacterium tuberculosis* dahil olmak üzere farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türlerine karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle antibiyotik olarak tanımlanmıştır (Ioi vd. 2017). İlk olarak 1942'de *Penicillium claviforme*'den izole edilen PAT, meyve, tahıl ve diğer gıdalarda büyüyen çok sayıda mantar türü tarafından üretilen küçük ama zengin işlevselliğe sahip bir antibiyotik olarak görülmüştür. Erken klinik deneyler, PAT'ın dermatomikoz tedavisinde yararlı olduğunu ortaya koymuştur. 1:20.000 ile 1:5.000 arasında değişen seyreltmelerde ise soğuk algınlığı tedavisinde etkili bir burun spreyi görevi görmüştür (Boukouvalas ve Maltais, 1995).

Doymamış bir heterosiklik lakton olan PAT, esas olarak elma ve elma ürünlerinde ve bazen de armut, üzüm, kayısı, çilek, yaban mersini ve şeftalide bulunur. PAT suda yüksek oranda çözünbilmesi ve asidik çözeltideki kararlı formu nedeniyle, meyve suları gibi elma türevi ürünlere kolaylıkla ulaşabilmektedir. PAT ile kontamine olmuş elma suyu, sadece PAT'ın etkileri nedeniyle değil aynı zamanda PAT'ın diğer mikotoksinler ile birleştiğinde ortaya çıkan toksik etkileri nedeniyle de insan sağlığı için tehlikelidir (Al-Hazmi, 2010).

1.2.1 PAT Toksisitesi

Yapısında konjuge çifte bağların bulunmasından ötürü PAT, elektrofilik bir yapı özelliği göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı nükleofilik gruplarla geri dönüşsüz olarak etkileşmektedir. Glutasyon dahil çeşitli proteinlerin ve DNA'nın yapısını kalıcı olarak değiştirerek toksisiteye neden olmaktadır (Garcia vd. 2009). En fazla eritrositlerde biriktiği tespit edilen PAT, böbrek, dalak, karaciğer ve akciğer organları gibi yapısında fazla kan bulunduran dokularda da birikme eğilimi göstermektedir. Sindirim sistemi kanalında epitel dejenerasyona, kanamaya, mide mukozasında ülserasyona, nötrofil ve mononükleer hücre varlığı gibi histopatolojik lezyonlara neden olduğu deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Appell vd. 2009). Klinik çalışmalar, PAT'ın immünotoksisiteye, genotoksisiteye,

teratojenisiteye, karsinojenisiteye, mutasyonlara ve çeşitli organlarda gastrointestinal sistem bozukluklarına, ödem ve kanamaya neden olduğunu göstermiştir (Zhang vd. 2019). PAT'ın sitotoksik ve kromozoma zarar veren etkilerini esas olarak hücrel esansiyel tiyollere kovalent bağlanarak adaklar oluşturarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. PAT'ın en olası hücrel hedeflerinden biri, çoğu hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunan sistein içeren tripeptit glutatyondur (Fliege, 2000). İnsanların ve hayvanların PAT'a maruz kalması; karaciğer, böbrekler, gastrointestinal sistem ve bağışıklık sistemi için oldukça toksiktir. Bu nedenle nefes darlığı, ödem, kasılmalar, pulmoner tıkanıklık ve gastrointestinal problemlere neden olmaktadır (Ramalingam vd. 2019).

1.2.2 PAT İle İlgili Mevzuatlar

Suda yüksek çözünürlüğü, ısıya karşı fazla olan direnci ve yüksek toksisitesi nedeniyle gıdalarda bulunan PAT miktarı, hükümetler ve düzenleyici kurumlar tarafından oluşturulan gıda güvenliği düzenlemeleri ile sınırlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile birlikte günlük maksimum PAT alımını vücut ağırlığına göre 0,4 µg/kg olarak belirlerken, Avrupa Birliği ise maksimum PAT düzeylerini meyve suyu için 50 µg/kg ve bebek elma suyu ve elma püresi için 10 µg/kg olarak belirlemiştir (Bayraç ve Camızcı, 2019). Türkiye, İsveç, Belçika, Rusya ve Norveç'de, elma suyunda izin verilen en yüksek PAT konsantrasyonunu 50 µg/L olarak belirlemiştir. Türk Gıda Kodeksi'nin (TGK), 28157 sayılı resmi gazetede yayımladığı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde elma ve türevi gıdalardaki PAT limit değerleri belirlenmiştir. Meyve suları, konsantrelerden üretilen meyve suyu ve meyve nektarlarında 50 µg/L, distile alkollü içecekler, elma şarabı ve elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkilerde 50 µg/L, katı haldeki elma ürünlerinde (elma kompostu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dahil) 25 µg/kg, bebek ve küçük çocuklar için üretilen katı haldeki elma ürünlerinde 10 µg/kg, tahıl bazlı olmayan ek gıdalarda 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (URL-1, 2021).

1.2.3 PAT Giderim Yöntemleri

Yasal düzenlemeleri olan ülkelerde bile meyve suyu işleyenlerin hammaddelerin kalitesini kontrol etme çabalarına rağmen, izin verilen maksimum seviyeden biraz daha yüksek seviyelerde PAT içeren numuneleri tespit etmek mümkündür. Sonuç olarak, meyve üreticileri, gıda işleyenler ve araştırmacılar çabalarını ham maddelerden son ürünlere kadar PAT kontaminasyonunu azaltacak stratejiler aramaya odaklamıştır. Bununla birlikte meyve sularındaki PAT seviyeleri, hasat öncesi uzaklaştırma yöntemleri her zaman yeterince düşük seviyede olmasını sağlamadığından gıda işleme sırasında bu toksini uzaklaştırmak veya parçalamak için farklı yaklaşımlara ihtiyaç duymaktadır. Bu anlamda, enzimlerin ve berraklaştırma maddelerinin eklenmesi gibi olağan işleme tekniklerinin, istikrarsız uzaklaştırma etkinliği ve diğer bileşenlerin istenmeyen kayıplarına yol açtığı rapor edilmiştir. Filtrasyon veya ultrafiltrasyon prosesleri çok sınırlı PAT giderme etkinliği göstermiştir. Ayrıca pastörizasyon gibi ısı işlemler de sınırlı PAT bozunma etkinliği göstermiştir. Ayrıca yoğun ısı işlemler meyve sularının organoleptik özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Son yıllarda, ısı olmayan yeni gıda işleme teknikleri, klasik ısı işlemlere alternatif olarak geliştirilmiştir (Rodríguez-Bencomo vd. 2020). Mikotoksin giderme yöntemleri genel olarak biyolojik bozunma, fiziksel ve kimyasal uzaklaştırma şeklinde olmaktadır. 1970 yılından bu yana, benzimidazol, fungusitler ve organik fosfor içeren bazı pestisitler, PAT üreten mantarların büyümesini engellemek ve böylece PAT kontaminasyonunu önlemek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, temiz etiketli ürünlere artan talep, yeni ve güvenli kimyasal yöntemlere ihtiyacı beraberinde getirmektedir. Flavonoidler ve glukosinolatlar gibi bitki kaynaklı aktif maddeler, PAT üreten mantarların büyümesini engelleyerek PAT birikimini azaltabilir. Ayrıca PAT'ın uzaklaştırılması için en etkili yöntem olan PAT'ı doğrudan reaksiyona sokarak dekontamine etmek için bir dizi kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kimyasal maddelerin kötüye kullanılması ürün kalitesine ciddi zarar verebilmekte ve bilinmeyen toksik ürünler üretebileceği için besin değerini azaltabilmektedir. PAT kontaminasyonunu ortadan kaldırmak ve gıda güvenliğini artırmak için fiziksel yöntemler de araştırılmaktadır. Bu yöntemler arasında, adsorpsiyon, sadeliği ve ekonomikliğinin yanı sıra çevre dostu etkisi nedeniyle en etkili PAT giderme işlemlerinden biri olarak kabul edilmiştir. Manyetik nanopartiküller, manyetik molekül baskılı adsorban, aktif karbon boncuklar,

grafen oksit, kalıplanmış ve işlevselleştirilmiş silika gibi çeşitli adsorbanların kontamine solüsyonlarda PAT seviyelerini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Bazı adsorbanların PAT'ın adsorpsiyonuna katkıda bulunan hidrojen bağları oluşturarak -SH, -NH₂ ve -OH grupları gibi daha geniş kapsamlı fonksiyonel gruplarla reaksiyona girebileceği ve bu özelliklerden yararlanarak, bazı organik (kitosan ve L-sistein gibi) ve inorganik (selenyum gibi) bileşenlerin PAT'ı adsorbe etme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, özellikle nano ölçekte çeşitli malzemelerin kombinasyonu, ortaya çıkan nanokompozit adsorbanın PAT dekontaminasyon kabiliyetini yoğunlaştırabileceği vurgulanmıştır (Paimard vd. 2021).

Fiziksel ve kimyasal yöntemler mikotoksinlerin içeriğini azaltabilse de, güvenlik sorunları, sınırlı etkinlik ve yüksek maliyetlerin ortaya çıkması gibi bazı sorunları beraberinde getirebilmektedir. Etkili ve güvenli şekilde mikotoksinlerin biyolojik olarak parçalanması; maya, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar tarafından sağlanabilmektedir. Biyolojik yöntemler, PAT üretimini kontrol etmek için PAT üreten mantarların büyümesini inhibe etmek veya verimli, güvenli ve ekonomik olan aktif mikroorganizma ajanlarının kullanılmasını ifade etmektedir (Zheng vd. 2021). *Saccharomyces cereviasae*, PAT'ı daha az toksisiteye sahip olan Askladiol'ün izomerlerine (Askladiol-E ve Askladiol-Z) indirgeyebilmektedir. Mevcut araştırmalar, PAT'ın bozulmasının, *S. cereviasae* tarafından üretilen indükleyici enzimlerin enzimatik reaksiyonlarının bir sonucu olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, az sayıda makalede PAT'ı parçalayan enzimler incelenmiştir. *S. cereviasae* tarafından PAT'ın bozundurulmasının metabolik mekanizması tam olarak netlik kazanamamıştır (Yang vd. 2021). Son yıllarda, antagonistik mayalar ve laktik asit bakterileri kullanan biyolojik bir yaklaşım, PAT'ı parçalamak için yenilikçi bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Ricelli ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada, *Gluconobacter oxydans*'ların 800 µg/mL PAT içeren elma suyunda PAT'ı %96 bozunma oranına kadar parçalayabildiğini tespit etmişler. Fuchs ve arkadaşları 2008 yılında yapmış olduğu çalışmada, 30 farklı LAB suşunun PAT azaltma kapasitesini karşılaştırarak, PAT'ın %80'inin *Bifidobacterium animalis* kullanarak bozunmuş olduğunu göstermiştir. Castoria ve arkadaşları 2011 yılında, bir biyolojik kontrol mayası *Rhodospiridium kratochvilovae* suşu LS11'in, PAT'ı desoksiPAT'ik aside indirgeyebildiğini göstermiştir. *Byssochlamys nivea*'nın FF1-2 suşunun, PAT'ı

parçalamak için mükemmel bir kapasiteye sahip olduğunu da ortaya konulmuştur (Zhao vd. 2018).

1.3 Çalışmanın Amacı

Hasat sonrasında gıdaların depolanması ve işlenmesi süreçlerini gıdanın güvenilirliğini doğrudan etkilemektedir. Ülkemizde elma ve ürünlerinde PAT kontaminasyonu literatür taraması bölümünden de anlaşılacağı üzere hala önemli bir sorundur. Bu durum PAT'ın ciddi toksik etkileri bulunması nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle ülkemizde elma ve ürünlerinde izleme çalışmaları yaparak mevcut durumu ortaya koymak ve mevzuattan sorumlu kurumlara ve tüketicilere bilgi sağlamak oldukça önemlidir. Böylece bu tez çalışmasının amacı; elma, elma suyu, elma suyu konsantresi ve ev yapımı elma sirkesinde toksik PAT düzeylerini belirlemek ve elmaların depolama süresi boyunca PAT kontaminasyonu değişimini incelemek, evsel ve fabrikasyon üretim koşullarının nasıl olduğu konusunda ilgilileri bilinçlendirmektir. Numunelerin toplandığı bölgede bu amaçlar doğrultusunda yapılmış bir çalışmaya literatür taramasında rastlanmamış olmasından dolayı yapılan tez çalışmasının sonuçları doğrultusunda bilime katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Türkiye’de Elma ve Elma Ürünlerinde PAT Düzeylerini İnceleyen Çalışmalar

Karadeniz ve Ekşi'nin (1995) çalışmalarında, Türkiye'den alınan 463 elma suyu konsantresi numunesi 1993-94 ve 1994-95 yıllarında analiz edilmiştir. Numunelerin %23,1'inin PAT içeriğinin 25 µg/L'den yüksek, %4,5'inin ise 50 µg/L'den yüksek olduğu gösterilmiştir.

Gökmen ve Acar'ın 1998 yılında yaptıkları çalışmada; 215 adet elma suyu konsantresinde PAT içeriği analizi yapılmıştır. Ticari elma suları, farklı elma suyu konsantrelerinin harmanlanmasıyla üretilmiştir. PAT, 7 ila 376 µg/L arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Analiz edilen tüm örneklerin %43,5'inin 50 µg/L'lik PAT kontaminasyon seviyesini aştığı gözlemlenmiştir (Gökmen ve Acar, 1998).

Gökmen ve Acar'ın 1999 yılında, elma suyu konsantresinde 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve PAT'ın eş zamanlı tayinini gerçekleştirdikleri çalışmada, PAT saptama sınırının 5µg/L olduğu ve PAT geri kazanımının %94 ile %125 seviyeleri arasında olduğu, ortalama %103'lük geri kazanım seviyesi bulunduğu gözlemlenmiştir (Gökmen ve Acar, 1999).

1996-99 yılları arasında üretilen elma suyu konsantrelerinin PAT içerikleri Gökmen ve Acar (2000) tarafından incelenmiştir. 1996 yılında üretilen elma suyu konsantrelerinin %48'inde ki PAT içeriği 50 µg/L'den yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada 1997 yılında PAT kontaminasyon seviyelerinin 1996 yılına göre hafif bir düşüş göstererek örneklerin %34'ünde limiti aştığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, 1998 ve 1999 yıllarında örneklerin PAT seviyelerinin önemli ölçüde daha iyi olduğu ve bu yıllarda üretilen örneklerin sadece %8'inin 50 µg/L'yi aştığı görülmüştür. Gökmen ve Acar'ın (2000) çalışmalarında en yüksek PAT konsantrasyonları 1996, 1997, 1998 ve 1999'da sırasıyla 376; 153; 103 ve 119 µg/L olarak tespit edilmiştir (Gökmen ve Acar, 2000).

Gökmen vd. 2001 yılında yapmış oldukları bir diğer çalışmada, elma suyu işlemede karşılaştırmalı temizleme tekniklerini ve bunların PAT içeriği, fenolik bileşikler ve organik asitler dahil diğer bazı kalite parametreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Geleneksel berraklaştırma ile birlikte aktif kömür muamelesi, elma suyunun PAT konsantrasyonunda %40,9'a varan yüksek bir azalma ile sonuçlanmıştır (Gökmen ve Acar, 2001).

Yapılan başka bir çalışmada, Türkiye'de pazarlanan elma suyunda PAT sıklığı incelenmiştir. Çalışmada 45 adet elma suyu örneği incelenip, örneklerin %60'ında PAT tespit edilmiştir. Çalışmada, elma suyu örneklerinin %44'ünün Türkiye'de izin verilen üst sınır olan 50 µg/L'den yüksek PAT kontaminasyon seviyelerine sahip olduğu görülmüştür (Yurdun vd. 2001).

Diğer bir çalışmada ise, elma suyu konsantrasyonunda PAT içeriği üzerine tiamin, hidroklorür, piridoksin, hidroklorür ve kalsiyum-d-pantotenatın etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, analizlerde kullanılan berrak elma suyu konsantrasyonunun PAT düzeyi 304 µg/L olarak bulunmuştur. Endişe verici ve şaşırtıcı olan durum, bu yüksek oranda kontamine meyve suyu konsantrasyonunun, 1999 yılında Türkiye'deki bir üreticiden doğrudan elde edilen ticari bir ürün olmasıdır (Yazıcı ve Velioglu, 2002).

Isıl işlem ve buharlaştırmanın PAT üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada tüm örneklerde PAT konsantrasyonları 50 µg/L'den yüksek bulunmuştur (Kadalkal ve Nas, 2003). PAT seviyesini düşürmede ısıl işlemin buharlaştırma işlemine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Aktaş vd. (2004) Isparta ilinde 5 farklı elma suyunda PAT tayini yaptıkları çalışmada, 15 ila 200 µg/L arasında değişen konsantrasyonlarda PAT tespit edilmiştir. Elma suyularının %46'sında PAT düzeylerinin 50 µg/L'den yüksek olduğunu göstermiştir (Aktaş vd. 2004).

Kadalkal vd. 2005 yılında yaptıkları çalışmada, Denizli'nin Çal köyündeki yerel bir fabrikadan, elma suyu üretimi için kullanılan ham elma örneklerinde PAT tayini gerçekleştirmişlerdir. Sağlam, %30, %60 ve %100 çürümüş elmalardan üretilen

meyve suyu örneklerinde PAT konsantrasyonları sırasıyla 0,3-2,0; 139-23; 504-630 ve 889,6-940,2 µg/L arasında değişmiştir (Kadalk vd. 2005).

Koca ve Ekşi'nin 2005 yılında yaptıkları çalışmada, elma suyu konsantresinde PAT içeriğinin 22 ve 30 °C'de 6 aylık depolama süresi boyunca azalması incelenmiştir. Sonuçlar, PAT içeriğindeki azalmanın, depolama sıcaklığına ve süresine bağlı olduğu göstermiştir. 22 ve 30°C'de 1 aylık depolama sonrası PAT azalması sırasıyla %45-64 ve %66-86 aralığında olmuştur. PAT seviyelerinin, 22 ve 30°C'de 4 aylık depolamadan sonra tespit edilebilir sınırların altında kaldığı belirtilmiştir (Koca ve Ekşi, 2005).

İçli tarafından (2019) yapılan bir çalışmada incelenen elma ekşisi örneklerinin tamamının PAT ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada saptanan PAT düzeyleri 20 ile 1416 µg/kg aralığında ve ortalama PAT miktarı 284 ± 307 µg/kg olarak bulunmuştur. Örneklerin %94,9'unda PAT içeriğinin 50 µg/kg'ye eşit veya daha büyük olduğu tespit edilmiştir (İçli, 2019).

Dural (2020) tarafından yapılan çalışmada, piyasada satılan 86 adet meyveli bebek mamasında PAT analizi yapılmıştır. 18 adet meyveli bebek maması ve 68 adet meyve suyu örneğinin incelendiği çalışmanın tüm örneklerinde ortalama PAT konsantrasyonu $38.24 \text{ ng/mL} \pm 39.64$ olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçlarının ışığında elde edilen PAT konsantrasyonları bebek maması için yasal sınırların üzerinde kalmaktadır (Dural, 2020).

2.2 Dünyada Elma ve Elma Ürünlerinde PAT Düzeylerini İnceleyen Çalışmalar

Leggott ve Shephard'ın (2001) 1996 ile 1998 yılları arasında Güney Afrika'nın Cape Town kentindeki çeşitli perakende satış noktalarından elde ettikleri elma, karışık meyve suyu, alkollü elma şarabı, elma püresi, elma sosu, jöle, konserve elma ve karışık meyve kompostosu olmak üzere toplam altmış örneğin PAT tayini yaptıkları çalışmada, toplam 31 meyve suyu örneğinin 23 tanesinde saptanabilir PAT kontaminasyonu gözlemlenmemiş olup, 8 meyve suyu örneğinin PAT kontaminasyonu 5 µg/L ile 45 µg/L değerleri arasında olup ortalamaları 10 µg/L olarak

belirlenmiştir. Toplam altı adet elma örneğinin ikisinde 10 µg/L PAT düzeyi gözlemlenmiştir. On adet bebekler için hazırlanan meyve suyu örneğinin altısında 5 µg/L ile 20 µg/L PAT kontaminasyon değerleri gözlemlenmiştir (Leggott ve Shephard, 2001).

Ritieni'nin (2003) İtalya'da perakende mağazalardan ve süpermarketlerden elde ettiği saf elma suyu, diğer meyve sularıyla karıştırılmış elma suyu, elma püresi, elma sirkesi, elma bazlı bebek maması ve elma kreması olmak üzere toplam 40 örnekte PAT tayini yaptığı çalışmada, dört ürün grubundan otuz üç örnekte saptanabilir PAT kontaminasyonu bulunmazken, 11 örneğin 1,4 µg/L ile 74,2 µg/L aralığında değişen PAT kontaminasyonuna sahip oldukları görülmüş olup, ortalama 26,7 µg/L PAT kontaminasyon değeri tespit edilmiştir. Elma sirkesi örneklerinde PAT kontaminasyonu gözlemlenmezken, 10 adet elma bazlı bebek maması örneğinin ikisinde 17,7 µg/L ve 13,1 µg/L PAT kontaminasyonu tespit edilmiştir. Bu kontamine 2 adet elma bazlı bebek maması örneğinin “organik gıda” olarak etiketlendiği de bildirilmiştir (Ritieni, 2003).

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada analiz edilen meyve suyu konsantrelerinin tamamında (Türkiye menşeli 23 elma suyu; n = 90) PAT tespit edilmiş ve en kontamine örnekler Türkiye'den ithal edilmiş olanlar olduğu belirlenmiştir (Moukas vd. 2008).

Barreira vd. (2010) Portekiz'de yapmış olduğu bir çalışmada ise, tercihen bebekler için veya küçük çocuklara yönelik olarak etiketlenmiş 62 elma suyu örneği ve 76 homojenize elma püresi incelenmiştir. PAT, 33 örnekte 1,2 µg/kg ile 42 µg/kg arasında değişen değerlerde tespit edilmiştir. Analiz edilen bebek içeceklerinde PAT tespit edilememiştir. Ancak bebekler ve küçük çocukların tüketimine yönelik etiketlenmiş beş homojenleştirilmiş elma püresinde PAT varlığı %7 olarak ölçülmüştür. Karışık meyve sularında, %13 pozitif örnek insidansına sahip saf elma sularına kıyasla daha yüksek pozitif örnek insidansı (%67) tespit edilmiştir (Barreira vd. 2010).

Yuan vd. (2010) yapmış oldukları çalışmada, Çin'in kuzeydoğusunda ki Changchun şehrinde yer alan yerel süpermarket ve mağazalardan, elma suyu, bebek maması, elma

suyu konsantresi ve karışık elma suyu dahil olmak üzere dört kategoriden toplam 95 numune temin edilerek PAT tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları, elma örneklerinin %16'sında PAT düzeyinin 50 µg/kg'den yüksek olduğunu göstermiştir. 95 adet örnekten sadece tüm numunelerin %12,6'sına denk gelen 12 örnekte PAT kontaminasyon düzeyi saptanabilir sınırların altında kalmıştır. Tüm numunelerin ortalama PAT içeriği 20,4 µg/kg olarak hesaplanmıştır (Yuan vd. 2010).

Brandon vd. 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada, küçük çocukların günlük PAT maruziyeti ve PAT kaynaklı zehirlenme riskleri incelenmiştir. Çalışmada 8 ila 48 aylık Hollandalı çocuklar için PAT alımı ve PAT zehirlenmesi riskleri hesaplanmıştır. Ek olarak, PAT'ın elma içeren ürünlerden elde edilebilirliği, PAT'ın daha rafine bir risk değerlendirmesi için araştırılmıştır. PAT'a maruz kalma oranı, %55 ile %100 arasında değişkenlik göstererek oldukça yüksek çıkmıştır. Organik elma ürününü fazla tüketen 13 ile 20 aylık çocukların günlük PAT maruziyeti 342 µg/kg olarak ölçülmüştür (Brandon, 2012).

Zaied vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada, 2011 yılında Tunus'ta bulunan büyük süpermatler ve mağazalardan toplanan elma suyu, bebek maması ve karışık meyve suyu dahil olmak üzere toplam 85 elma ürünü numunesini PAT tayini için incelemiştir. Araştırma sonuçları PAT kontaminasyon insidansının %35 olduğunu göstermiştir. Numunelerde belirlenen toplam PAT kontaminasyon seviyeleri 0 ile 167 µg/L arasında değişmekte olup, ortalama PAT kontaminasyonu ise 20 µg/L olarak tespit edilmiştir. Meyve suyu örneklerinin %18'i ve bebek maması örneklerinin %28'inin sırasıyla, 50 µg/L ve 10 µg/L olan Avrupa Birliği'nin belirlediği tolere edilebilir sınırları aştığı gözlemlenmiştir.

Iqbal vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada; Pakistan'da pazarlanan ve tüketilen çeşitli meyve, meyve suları ve karsanbaçlarda PAT'ın doğal mevcudiyeti araştırılmıştır. Sonuçlar, 237 örnekten 136'sının (%57,4), PAT kontaminasyonu olduğunu, değerlerin 0,04 ila 1100 µg/kg arasında değiştiğini göstermiştir (Iqbal vd. 2018).

Dos Santos ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada, kontrollü atmosfer şartları altında elmalarda ki PAT düzeyleri incelenmiştir. Kontrollü atmosfer, dinamik kontrollü atmosfer ve 1-metilsiklopropan uygulaması altında elmalarda PAT ile kontaminasyon değerlendirilmiştir. Bütün çürümüş elmaların PAT ile kirlendiği, sağlıklı elmaların çürüyen elmaların varlığına rağmen PAT ile kontamine olmadığı ve 1-metilsiklopropan uygulamasının “Galaksi” cinsi elmalarda PAT konsantrasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Dos Santos vd. 2018).



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Yapılan çalışmada materyal olarak elma, elma suyu, elma sirkesi ve elma suyu konsantresi kullanılmıştır. Katı elma numuneleri, elma suları, elma sirkeleri ve elma suyu konsantreleri Antalya ilinin Korkuteli ilçesinden toplanmıştır. Elma materyali olarak kullanılan numunelerin hepsi, bölgede ve Türkiye’de en çok üretimi yapılan Golden Delicious çeşidi elmalardan oluşmaktadır.

3.2 Materyal Temini

X, Y, Z, T, K olmak üzere toplam 5 soğuk hava deposundan 3 kez tekrarlanarak 4’er adet katı elma örneği toplanmıştır. Her bir soğuk hava deposundan her seferinde; sağlam elma örneği, kontamine sağlam elma örneği, yarı çürük elma örneği ve çürük elma örneği olmak üzere toplam 60 numune toplanmıştır. Kontamine sağlam elma örnekleri, çürük elmalarla temas halinde bulunan sağlam elmalardan seçilmiştir. Türkiye’deki düşük kapasiteli tesisler için hammaddenin saklama koşulları tipik meyve suyu üretimine göredir. Elma suyu fabrikaları Eylül ayının ortasından itibaren elma almaya başlamaktadır. Bu dönemde alınan elmaların bir kısmı işlenmekte, gerisi ise muhafaza edilmek üzere depolanmaktadır (Kadalk vd. 2005). Bu nedenle numune toplamasının ilk aşaması 2020 yılının Eylül ayında, 2’inci aşaması Ekim ayında, 3’üncü aşaması ise Kasım ayında gerçekleştirilmiştir. Toplam 5 adet elma suyu örneği bölgede meyve suyu üretim tesislerinden temin edilmiştir. Araştırma kapsamında kullanılan toplam 7 adet elma sirkesi ev yapımı olup, yöredeki ailelerden temin edilmiştir. Toplam 5 adet elma suyu konsantresi ise, bölgedeki tesislerden temin edilmiştir.

3.3 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Asetik asit (buzlu), susuz sodyum sülfat ve sodyum karbonat (reaktif saflığında) Merck’ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. PAT standart solüsyonu (100

$\mu\text{g/mL}$) (asetonitril içinde hazırlanmış), Asetonitril ve etil asetat (HPLC saflığında) Sigma Aldrich'ten (St-Louis, MO, ABD) elde edilmiştir.

3.4 Kullanılan Araçlar

Human Power 2 saf su sistemi (Seul, Kore Cumhuriyeti), Sartorius CPA225D hassas terazi (Göttingen, Almanya), VELP SCIENTIFICA CLASSIC vortex mikseri (Milano, İtalya), öğütücü, pastör pipeti, falkon tüpü, otomatik pipet, kağıt süzgeç, deney tüpü, huni, spatül, 276 nm'de bir dizi diyot dedektörü (DAD) ile donatılmış HPLC sistemi (Shimadzu LC-20A Prominence serisi, Kyoto, Japonya).

3.5 Metot

Katı elma örnekleri ayrı ayrı küçük dilimlere bölünerek blenderda (öğütücü) öğütülmüştür. Öğütülen numuneler kilitli buzdolabı poşetlerine aktarılmıştır. Öğütme sırasında olası kontaminasyonları engellemek için öğütücü haznesi ve parçalayıcı bıçak her öğütme işleminden sonra dezenfekte edilmiş ve etil asetat ile yıkanmıştır. İkinci aşama olarak öğütülen numunelerin pH ve Brix değerleri ölçülmüştür. Numunelerin pH ve Brix analizleri sırasında TS 1728 ISO 1842 ve TS 4890 standart yöntemlerine göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan pH ölçüm cihazı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 pH ölçümlerinin yapıldığı milwaukee marka pH ölçüm cihazı

3.5.1 Numunelerden PAT Ekstraksiyonu

Sağlam, kontamine sağlam ve yarı çürük elma numunelerinden 5'er g, çürük elma numunelerinden 1'er g ve sıvı numunelerden 5'er ml alınarak örnekler 50 ml'lik falkon

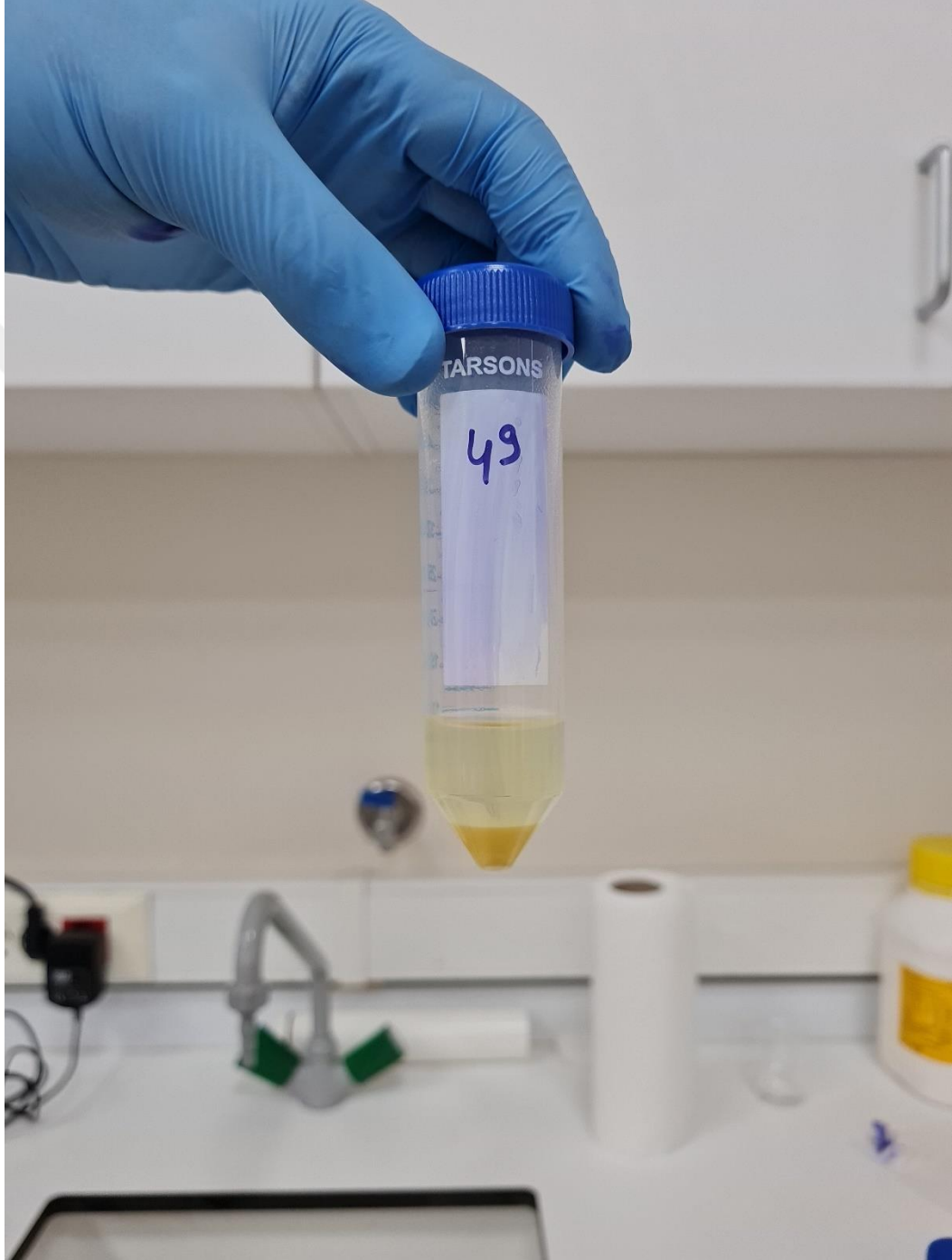
tüplerinde tartılmıştır. Tartım işleminin yapıldığı Sartorius CPA225D Hassas Terazı (Göttingen, Almanya) Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Sartorius CPA225D Hassas Terazı (Göttingen, Almanya)

Falkon tüplerine alınan numunelerin üzerine 5’er ml etil asetat eklenip 1’er dk VELP SCIENTIFICA CLASSIC Vortex Mikseri (Milano,İtalya) ile vortekslenmiştir.

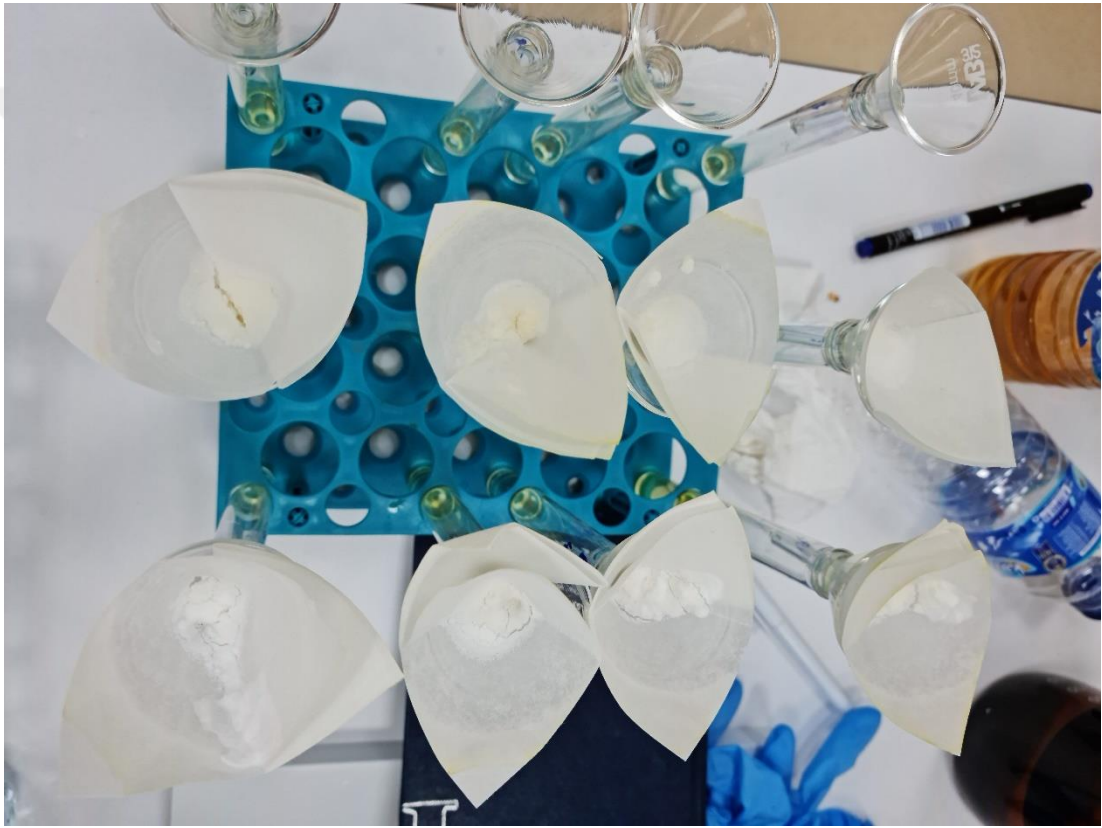
Vorteksleme işlemi bittikten sonra örneklerin fazları birbirinden ayrıldığında pastör pipeti kullanılarak üst faz başka bir falkon tüpüne aktarılmıştır. Fazların birbirinden ayrılması Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Fazların birbirinden ayrılması

Altta kalan faza tekrar 5 ml etil asetat eklenip tekrar 1 dk boyunca vorteksleme işlemi yapılmıştır. Vorteksleme işlemi bittikten sonra tekrar fazlar ayrılınca üst faz tekrar

pastör pipeti ile alınıp, önceki fazın aktarıldığı falkon tüpüne aktarılmıştır. Üst fazların aktarıldığı falkon tüplerine 1 ml %1,5'luk Na_2CO_3 eklenerek tüpler tekrar 1'er dk vortekslenmiştir. Faz ayrımı gerçekleştiğinde üst fazlar tekrar yeni falkon tüplerine aktarılmıştır. Dipte kalan kısma 2,5 ml etil asetat eklenip, 30 sn tekrar vortekslenip üst faz bir önceki üst fazın aktarıldığı tüpe aktarılmıştır. Üst fazların alındığı tüplere 1,25 gr sodyum sülfat ilave edilip vorteks ile birkaç sn vortekslenmiştir. Vortekslenen bu fazlar süzgeç kağıdından cam tüplere süzölmüştür. Numunenin süzgeç kağıdından cam tüplere süzölmesi Şekil 3.4'te gösterildiğı gibi yapılmıştır.



Şekil 3.4 Numunenin kağıt süzgeçten cam tüplere süzölmesi

Süzme işlemi tamamlandıktan sonra süzgeç kağıtları 1 ml etil asetat ile yıkanmıştır. Cam tüp içerikleri nazik azot akışı altında 40°C'de azot uçurma cihazında kurutulmuştur. Kuruyan tüplere 1 ml pH'ı 4 ultra saf su ilave edilip vortekslenerek çözüldürölmüştür. Daha sonra mikrofiltreden süzölp vialle alınmıştır. Vialler HPLC'de analiz edilme aşamasına kadar -18 °C'de korunup daha sonrasında analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

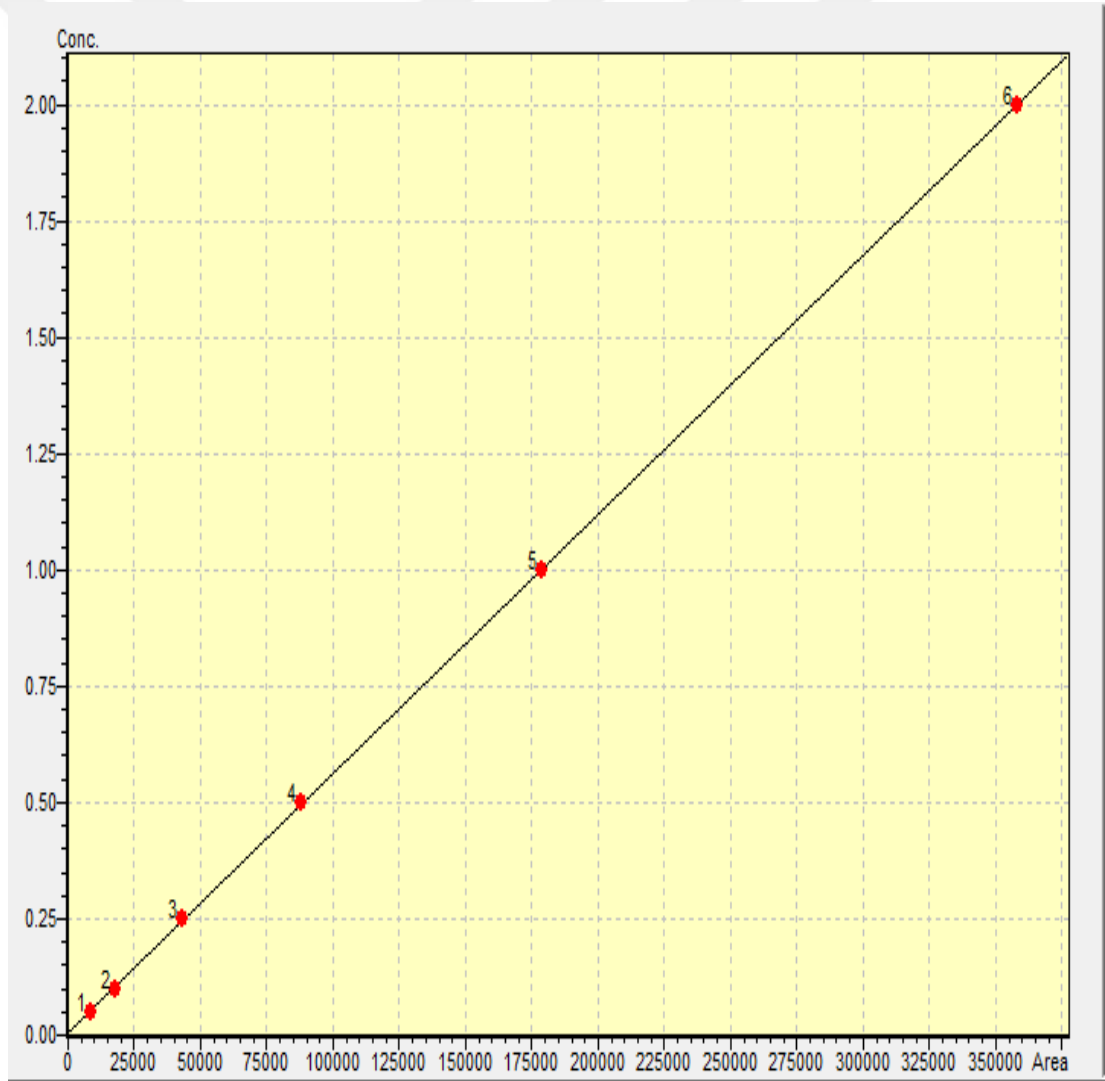
3.5.2 PAT Analizi

PAT tespiti için yaygın olarak kromatografi, (ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi, mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi) etkili bir teknik olarak kullanılmaktadır (Soldatkin vd. 2017). HPLC UV/DAD yöntemi, daha düşük maliyet ve daha iyi tespit limiti, doğrusallık, kesinlik, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik nedeniyle araştırma çalışmaları ve rutin analizler için daha yaygın olarak kullanılmakta olduğundan bu çalışmada PAT HPLC UV/DAD yöntemi ile belirlenmiştir. Analizde kullanılmış olan solventler HPLC’de kullanıma uygun saflıktadır. Kullanılmış olan HPLC cihazının çalışma şartları aşağıda ifade edilmiştir.

Ekipman	: Shimadzu
Degazör	: DGU-20 A 5R Prominence
Pompa	: LC-20 AT Prominence
Kontrol Ünitesi	: CBM-20A Prominence
Dedektör	: SPD-M20A DAD
Otomatik Örnek Enjeksiyon Ünitesi	: SIL-20AC HT
Kolon Fırını	: CTO-10AS VP
Kolon	: Inertsil ODS-3 (5 µm-150x4,6 mm)
Akış Hızı	: 1,5 ml/dk
Mobil Faz A	: (7:93) / (ACN: su)
Enjeksiyon hacmi	: 50 µL
Kolon fırın sıcaklığı	: 25 °C

3.6 Metot Validasyonu

Doğrusallık, 0,05–2,0 µg/mL aralığında standart PAT çözeltileri kullanılarak oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi aracılığıyla değerlendirilmiş olup kalibrasyon grafiği Şekil 3.5.'te verilmiştir. Yöntemin tespit limiti (LOD) ve miktar tayin limiti (LOQ) sırasıyla 3xsinyal/gürültü ve 10xsinyal/gürültü olarak belirlenmiştir. Geri kazanımı ve kesinliği belirlemek için, iki farklı PAT konsantrasyonuna (0,15 ve 1,5 µg/mL) sahip çözelti uygun miktarlarda standart maddenin kör numune içinde hazırlanması ile elde edilmiş ve her konsantrasyonun altı bağımsız tekrarı analiz edilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik, yüzde relatif standart sapma (%RSD) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.5 PAT kalibrasyon grafiği

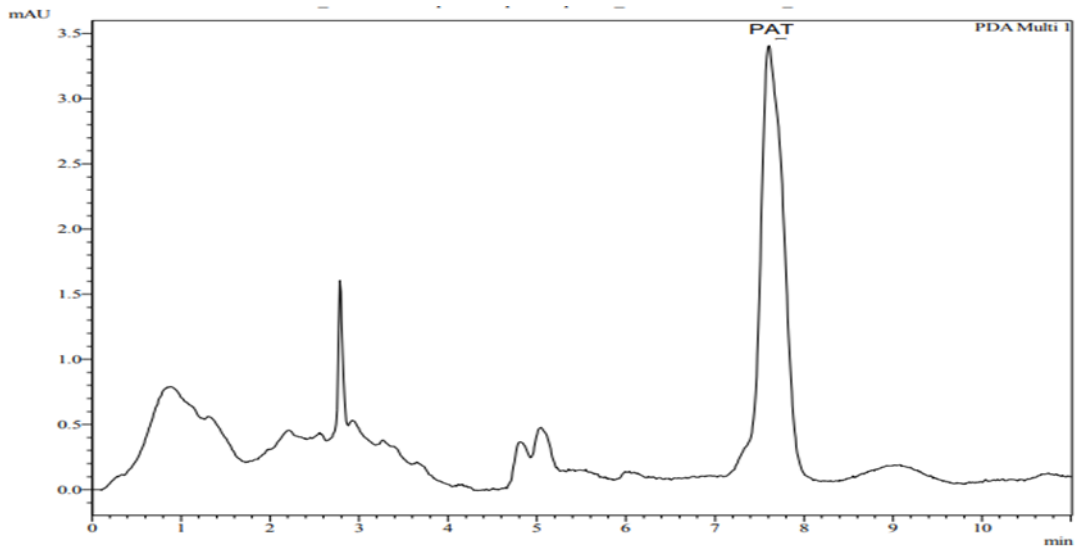
3.7 İstatistiki Analiz

Analizlerde Kastamonu Üniversitesi'nce sağlanan SPSS 23 programı kullanılmıştır. Grupların normalliği Shapiro-Wilk testi, homojenliği Levene's testi ile kontrol edilmiştir. Test sonuçlarına göre grupların çoğunluğu homojen olsa da hepsi normal dağılım göstermedikleri ve grupların numune sayıları 30'dan az olduğu için analiz edilen PAT türlerine ait sonuçların arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için non-parametrik Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Grupların analiz parametreleri sonuçlarının ortalamalarının karşılaştırılması için ONE-WAY ANOVA testlerinden Duncan testi kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Örnek bir numunede PAT alıkonma süresini de gösteren HPLC kromatogramı görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin PAT için 0,99997 korelasyon katsayısı (R^2) değerleriyle standartların çalışma aralığı aralığında doğrusal olduğu görülmüştür. Numunelerin çoğunun PAT seviyeleri, kalibrasyon aralığını aşmamıştır. Kalibrasyon aralığının üzerinde PAT seviyelerine sahip numuneler, aralığa uyacak şekilde uygun oranlarda seyreltilmiş ve ardından analiz edilmiş olup PAT miktarları hesaplanırken bu seyreltmeler dikkate alınmıştır. PAT'a ait LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,004 $\mu\text{g/L}$ ve 0,012 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Düşük konsantrasyon için (0,15 $\mu\text{g/mL}$) tekrarlanabilirliğin % relatif standart sapması (%RSDr), tekrarüretilebilirliğin % relatif standart sapması (%RSDR) ve % geri kazanım sonuçları sırasıyla %5,6; %5,8 ve %103,3 olarak bulunmuştur. Yüksek konsantrasyon için (1,5 $\mu\text{g/mL}$) tekrarlanabilirliğin % relatif standart sapması (%RSDr), tekrarüretilebilirliğin % relatif standart sapması (%RSDR) ve % geri kazanım sonuçları sırasıyla %1,0; %5,1 ve %98,9 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik için %RSD'ler %20'nin oldukça altında bulunmuş olup düşük ve yüksek konsantrasyon seviyeleri için elde edilen geri kazanım sonuçları da oldukça tatmin edici olarak görülmektedir.



Şekil 4.1 32 nolu yarı çürük elma numunesinin PAT kromatogramı

Çalışmamızda incelenen numunelerin analiz sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Numunelere uygulanan PAT, pH ve Briks analiz sonuçları

	Numune kodu	PAT $\mu\text{g}/\text{kg}$ veya $\mu\text{g}/\text{L}$	pH	Briks (% w/w veya w/v)
1	X SE1	0	3,95	12
2	Y SE1	0	3,45	11
3	Z SE1	1	4,28	11
4	T SE1	0	4,09	13
5	K SE1	0	4,11	15
6	X KSE1	4,4	4,31	12
7	Y KSE1	2	4,05	11
8	Z KSE1	8,6	3,58	14
9	T KSE1	4	3,98	16
10	K KSE1	4	4,15	13
11	X YÇE1	13,6	4,11	16
12	Y YÇE1	50	3,73	16
13	Z YÇE1	40	3,60	13
14	T YÇE1	141,4	4,47	10
15	K YÇE1	75,4	4,38	21
16	X ÇE1	306,2	3,91	10
17	Y ÇE1	351	3,27	12
18	Z ÇE1	12.881	3,97	16
19	T ÇE1	227	3,62	12
20	K ÇE1	140	3,55	17
21	X SE2	0	4,45	10
22	Y SE2	0	4,25	11
23	Z SE2	1,4	4,21	15
24	T SE2	1	4,15	13
25	K SE2	0	4,37	10
26	X KSE2	12,6	4,16	16
27	Y KSE2	7,4	4,14	11
28	Z KSE2	7	4,25	13
29	T KSE2	5	4,15	16
30	K KSE2	3,4	3,33	15
31	X YÇE2	362,2	4,01	21
32	Y YÇE2	68	3,89	12
33	Z YÇE2	49,2	4,14	12
34	T YÇE2	113,2	4,60	14
35	K YÇE2	189,8	4,37	16
36	X ÇE2	4.725	3,90	16
37	Y ÇE2	14.125	3,39	12
38	Z ÇE2	114	3,40	13
39	T ÇE2	10.695	3,40	14
40	K ÇE2	276	4,22	13
41	X SE3	2	4,58	15
42	Y SE3	1	3,83	14
43	Z SE3	1	4,05	13

Tablo 4.1'in devamı

	Numune kodu	PAT $\mu\text{g}/\text{kg}$ veya $\mu\text{g}/\text{L}$	pH	Briks (% w/w veya w/v)
44	T SE3	3	4,25	17
45	K SE3	1,2	4,10	13
46	X KSE3	14,4	3,90	14
47	Y KSE3	32,4	4,68	16
48	Z KSE3	53,8	4,34	11
49	T KSE3	4,2	4,01	19
50	K KSE3	7	4,34	13
51	X YÇE3	153,4	3,74	12
52	Y YÇE3	53,8	5,54	11
53	Z YÇE3	70	4,50	14
54	T YÇE3	6.702,8	4,19	12
55	K YÇE3	49	3,78	14
56	X ÇE3	499	4,25	13
57	Y ÇE3	6.548	4,31	18
58	Z ÇE3	157	4,34	13
59	T ÇE3	36.496	3,25	16
60	K ÇE3	275	4,53	18
61	ELMA SUYU 1	24,4	3,65	11
62	ELMA SUYU 2	7,4	3,67	11
63	ELMA SUYU 3	7	3,52	10
64	ELMA SUYU 4	7,8	3,68	10
65	ELMA SUYU 5	26,6	3,01	11
66	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 1	62,2	3,37	1
67	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 2	75,2	4,05	0
68	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 3	32,4	3,19	3
69	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 4	2	3,13	1
70	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 5	35,8	3,74	0
71	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 6	71,4	3,17	1
72	EV YAPIMI ELMA SİRKEŞİ 7	56,2	3,33	2
73	ELMA SUYU KONSANTRESİ 1	14,8	3,24	71
74	ELMA SUYU KONSANTRESİ 2	12	3,74	71
75	ELMA SUYU KONSANTRESİ 3	104,8	3,12	71
76	ELMA SUYU KONSANTRESİ 4	2,6	4,52	72
77	ELMA SUYU KONSANTRESİ 5	6,6	3,41	72
78	ELMA SUYU KONSANTRESİ 6	61,2	3,03	71

SE: Sağlam elma, KSE: Kontamine sağlam elma, YÇ: Yarı çürük elma, ÇE: Çürük elma, Elmaların yanında yer alan 1: 1'inci ayda toplanan numuneleri, 2: 2'inci ayda toplanan numuneleri, 3: 3'üncü ayda toplanan numuneleri, ev yapımı elma sirkelerinin ve elma suyu konsantrelerinin yanında yer alan numaralandırmalar örnek numaralarını ifade etmektedir.

Çalışmamızda depolamanın 3. ayında alınan bir çürük elma numunesinde (36.496 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en yüksek PAT kontaminasyonuna rastlanmıştır (Tablo 4.1). Tüm numunelerin ortalama PAT konsantrasyonu 1.240,246 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak bulunmuştur. Elma suları numunelerinin hiçbirinin PAT düzeyi 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 'yi aşmamıştır. Ancak elma suyu konsantresi numunelerinden ikisinin PAT düzeyi 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 'nin üzerinde çıkmıştır. Ev yapımı elma sirkeleri numunelerinin ise 4 tanesinin 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 'nin üstünde PAT içerdiği belirlenmiştir. Bu durum ev yapımı elma sirkelerinin hijyen koşullarının iyi olmadığını

belki de çürükleri iyi ayıklanmamış numunelerin üretimde kullanıldığını göstermektedir.

Tablo 4.2 Tüm numunelere ait tanımlayıcı istatistikler

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
PAT	78	0,00	36.496,00	1.240,2462	4.838,89082
pH	78	3,01	5,54	3,9285	0,47132
Briks	78	0,00	72,00	16,9103	16,38750

N: Numune sayısı

Aynı şekilde elma suyu konsantreleri de belki de konsantrasyon nedeniyle suyun uzaklaşması ve buna bağlı olarak PAT içeriğinin zenginleşmesi nedeniyle sağlık riski taşıyan bir numune grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde PAT kontaminasyonu bir sorun olarak gözükmemekte ancak, yapılan literatür taramasında ülkemizde elma ve ürünlerinde PAT düzeylerini araştıran çok az sayıda çalışmanın yapıldığı görülmektedir. Karadeniz ve Ekşi'nin (1995) çalışmalarında, Türkiye'den alınan 463 elma suyu konsantresi numunesi 1993-94 ve 1994-95 yıllarında analiz edilmiştir. Numunelerin %23,1'inin PAT içeriğinin 25 µg/L'den yüksek, %4,5'inin ise 50 µg/L'den yüksek olduğu gösterilmiştir. Konsantre elma sularının incelendiği bir çalışmada, tüm elma suyu konsantresi numunelerinde PAT 7 ila 376 µg/L aralığında belirlenmiştir. Analiz edilen tüm örneklerin %46'sının PAT seviyeleri 50 µg/L'yi aşmıştır (Gökmen ve Acar, 1998). 1996-99 yılları arasında üretilen elma suyu konsantrelerinin PAT içerikleri Gökmen ve Acar (2000) tarafından incelenmiştir. 1996 yılında üretilen elma suyu konsantrelerinin %48'inde ki PAT içeriği 50 µg/L'den yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada 1997 yılında PAT kontaminasyon seviyelerinin 1996 yılına göre hafif bir düşüş göstererek örneklerin %34'ünde limiti aştığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, 1998 ve 1999 yıllarında örneklerin PAT seviyelerinin önemli ölçüde daha iyi olduğu ve bu yıllarda üretilen örneklerin sadece %8'inin 50 µg/L'yi aştığı görülmüştür. Gökmen ve Acar'ın (2000) çalışmalarında en yüksek PAT konsantrasyonları 1996, 1997, 1998 ve 1999'da sırasıyla 376; 153; 103 ve 119 µg/L olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada elma sularının %60'ında PAT 19,1 ila 732,8 µg/L aralığında bulunmuş ve örneklerin %44'ünde PAT seviyesi 50 µg/L'yi geçmiştir (Yurdun vd. 2001). Elma suyu konsantresinin PAT içeriği üzerine tiamin hidroklorür, piridoksin hidroklorür ve kalsiyum-d-pantotenatın etkileri bir

çalışmada araştırılmıştır (Yazıcı ve Veliöğlu, 2002). Bu çalışmada, analizlerde kullanılan berrak elma suyu konsantresinin PAT düzeyi 304 µg/L olarak bulunmuştur. Endişe verici ve şaşırtıcı olan durum, bu yüksek oranda kirlenmiş meyve suyu konsantresinin, 1999 yılında Türkiye'deki bir üreticiden doğrudan elde edilen ticari bir ürün olmasıdır. Türkiye'de yapılan bir başka araştırma, üç farklı şirkete ait tüm elma suyu konsantrelerinin %46'sında PAT düzeylerinin 50 µg/L'den yüksek olduğunu göstermiştir. (Aktaş vd. 2004). Isıl işlem ve buharlaştırmanın PAT üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada tüm örneklerde PAT konsantrasyonları 50 µg/L'den yüksek bulunmuştur (Kadalkal ve Nas, 2003). PAT seviyesini düşürmede ısıl işlemin buharlaştırma işlemine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada analiz edilen meyve suyu konsantrelerinin tamamında (Türkiye menşeli 23 elma suyu; n = 90) PAT tespit edilmiş ve en kontamine örnekler Türkiye'den ithal edilmiş olanlar olduğu belirlenmiştir (Moukas vd.2008). Karaköse ve arkadaşları (2015) meyve bazlı 6 bebek mamasını analiz etmiştir. Bu çalışmada tüm örneklerde belirlenen PAT düzeyi ≤ 3 µg/kg olarak bulunmuştur. Bu nedenle, analiz edilen örneklerin tümü PAT maruziyeti açısından güvenli görülmüştür. Elma grupları ve elma suyu grubuna ait analiz sonuçları istatistiki olarak One Way Anova Duncan testi ile kıyaslanmış (Tablo 4.2.) ve depolamanın 3. Ayında toplanan çürük numune grubunun istatistiki olarak anlamlı şekilde yüksek PAT ortalamasına sahip olduğu onu sırasıyla 2. Ayda toplanan çürük elmalar ile 1. ayda toplanan çürük elmaların izlediği belirlenmiştir. Depolamanın 3. Ayında sağlam elmaların bile muhtemelen depo ortamı havasından ya da dıştan görülmeyen elmaların çekirdeklerine yakın kısımda içten çürümeye başlamış olma ihtimalinden kaynaklı olabilecek kontaminasyon nedeniyle çok az miktarda da olsa PAT içerdiği tespit edilmiş ve PAT miktarının istatistiki olarak anlamlı farklılık olmasa bile çürüğe bitişik, kontamine sağlam elmalarda depolama süresiyle beraber arttığı da belirlenmiştir. Numunelerin pH ve briks değerleri de istatistiki olarak anlamlı bulunmasa da depolama periyodunda artışlar sergilemiştir.

Tablo 4.3 Elma ve elma suyu gruplarının analiz sonuçlarının ortalama değerlerinin istatistiki olarak karşılaştırılması

GRUP NO	NUMUNE GRUBU	PAT $\mu\text{g}/\text{kg}$ veya $\mu\text{g}/\text{L}$	pH	Briks (% w/w veya w/v)
1	SE1	0,2 ^a	3,98 ^{abc}	12,40 ^{abc}
2	KSE1	4,6 ^a	4,01 ^{abc}	13,20 ^{abc}
3	YÇE1	64,08 ^a	4,06 ^{bc}	15,20 ^{bc}
4	ÇE1	2.781,04 ^{ab}	3,66 ^{ab}	13,40 ^{abc}
5	SE2	0,48 ^a	4,29 ^c	11,80 ^{ab}
6	KSE2	7,08 ^a	4,01 ^{bc}	14,20 ^{abc}
7	YÇE2	156,48 ^a	4,20 ^{bc}	15,00 ^{bc}
8	ÇE2	5.987,00 ^{ab}	3,66 ^{ab}	13,60 ^{abc}
9	SE3	1,64 ^a	4,16 ^{bc}	14,40 ^{bc}
10	KSE3	22,36 ^a	4,25 ^c	14,60 ^{bc}
11	YÇE3	1.405,80 ^a	4,35 ^c	12,60 ^{abc}
12	ÇE3	8.795,00 ^b	4,14 ^{bc}	15,60 ^c
13	ELMA SUYU	14,64 ^a	3,51 ^a	10,60 ^{bc}

Aynı sütünadaki farklı üssel harfler grupların ortalama değerlerinin istatistiki olarak anlamlı farklılık gösterdiğini belirtmektedir

Elma ve elma suyu gruplarının analiz sonuçlarının arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı da grupların çoğu homojen ve normal dağılım gösterdiği için Pearson korelasyon testi ile incelenmiş (Tablo 4.4.) ve PAT ile pH arasında zıt yönlü ve istatistiki olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. PAT'ın düşük pH'larda stabil olduğu bilinmektedir (Collin vd. 2008). Bu nedenle pH azaldıkça PAT miktarının artması düşük pH'larda daha kararlı olması ve kolay bozunmamasına bağlanabilir.

Tablo 4.4 Elma ve elma suyu gruplarının analiz sonuçlarının arasında istatistiki anlamlı bir ilişki olup olmadığının incelenmesi

		PAT	pH	Briks
PAT	Korelasyon Katsayısı	1	-0,293*	0,150
	P	-	0,018	0,233
	N	65	65	65
pH	Korelasyon Katsayısı	-0,293*	1	0,088
	P	0,018	-	0,485
	N	65	65	65
Briks	Korelasyon Katsayısı	0,150	0,088	1
	P	0,233	0,485	-
	N	65	65	65

N: Numune sayısı, P: Anlamlılık, * P < 0,05 düzeyinde anlamlı korelasyon

Çalışmamızda sirke numunelerinin ortalama PAT konsantrasyonu 47,89 µg/L olarak tespit edilmiş olup (Tablo 4.5) bu değer yasal limite çok yakındır. Ev yapımı elma sirkesi numunelerinin 4 tanesinin 50 µg/L' nin üstünde PAT içerdiği belirlenmiş olup ev koşullarında sirke üretiminin koşullarının PAT kontaminasyonu açısından uygun olmadığı anlaşılmaktadır. İnci tarafından 2019 yılında yapılan elma tez çalışmasında PAT düzeyleri incelenen 33 adet sirke (çoğu elma olmak üzere farklı meyvelerden üretilen ev yapımı sirkeler) örneğinin 6 tanesinin (1 tanesi alıç, 1 tanesi hurma diğerleri elma ham maddeli) 50 µg/L' nin üstünde PAT içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma da bizim çalışmamız gibi ev yapımı sirke üretiminin toksik PAT içeriği bakımından halk sağlığını tehdit edebileceğini göstermektedir. Elma sirkesi numunelerinin analiz sonuçlarının arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.5 Sirke numunelerine ait tanımlayıcı istatistikler

	Ortalama	Standart sapma	N
PAT	47,89	26,03	7
pH	3,43	0,34	7
Briks	1,14	1,07	7

N: Numune sayısı

Tablo 4.6 Elma sirkesi numunelerinin analiz sonuçlarının arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını istatistiki incelenmesi

		PAT	pH	Briks
PAT	Korelasyon Katsayısı	1	0,426	-0,227
	P	-	0,341	0,625
	N	7	7	7
pH	Korelasyon Katsayısı	0,426	1	-0,683
	P	0,341	-	0,091
	N	7	7	7
Briks	Korelasyon Katsayısı	-0,227	-0,683	1
	P	0,625	0,091	-
	N	7	7	7

N: Numune sayısı, P: Anlamlılık

Elma suyu konsantresi numunelerinin ortalama PAT içeriği 33,67 µg/L olarak tespit edilmiş ve 2 konsantre numunesinin PAT konsantrasyonları 50 µg/L'nin üzerinde bulunmuştur. Bu da ülkemizde elma suyu konsantrelerinde yukarıda daha önce sözü edilen PAT kontaminasyonu sorununun günümüzde de devam ettiğini göstermektedir. Elma suyu konsantresi numunelerinin analiz sonuçlarının arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını istatistiki incelenmesi neticesinde tıpkı elmalar ve elma sularında olduğu gibi pH ile PAT arasında istatistiki anlamlı ve zıt yönlü bir ilişki tespit edilmiş olup yine bunun düşük pH'larda PAT'ın kararlı olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Tablo 4.7 Elma suyu konsantresi numunelerine ait tanımlayıcı istatistikler

	Ortalama	Standart sapma	N
PAT	33,67	40,84	6
pH	3,51	0,55	6
Briks	71,33	0,52	6

N: Numune sayısı

Tablo 4.8 Elma suyu konsantresi numunlerinin analiz sonuçlarının arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının istatistiki incelenmesi

		PAT	pH	Briks
PAT	Korelasyon Katsayısı	1,000	-0,886*	-0,551
	P	-	0,019	0,257
	N	6	6	6
pH	Korelasyon Katsayısı	-0,886*	1,000	0,635
	P	0,019	-	0,175
	N	6	6	6
Briks	Korelasyon Katsayısı	-0,551	0,635	1
	P	0,257	0,175	-
	N	6	6	6

N: Numune sayısı, P: Anlamlılık, * $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı korelasyon

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda en yüksek PAT kontaminasyonuna depolamanın 3. ayında alınan bir çürük elma numunesinde (36.496 µg/kg) rastlanmıştır. Tüm numunelerin ortalama PAT konsantrasyonu 1.240,246 µg/kg olarak bulunmuştur. Elma grupları ve elma suyu grubuna ait analiz sonuçları istatistiki olarak One Way Anova Duncan testi ile kıyaslanmış (Tablo 4.2.) ve depolamanın 3. Ayında toplanan çürük numune grubunun istatistiki olarak anlamlı şekilde yüksek PAT ortalamasına sahip olduğu onu sırasıyla 2. Ayda toplanan çürük elmalar ile 1. ayda toplanan çürük elmaların izlediği belirlenmiştir. Depolamanın 3. Ayında sağlam elmaların bile muhtemelen depo ortamı havasından ya da dıştan görülmeyen elmaların çekirdeklerine yakın kısımda içten çürümeye başlamış olma ihtimalinden kaynaklı olabilecek kontaminasyon nedeniyle çok az miktarda da olsa PAT içerdiği tespit edilmiş ve PAT miktarının istatistiki olarak anlamlı farklılık olmasa bile çürüğe bitişik, kontamine sağlam elmalarda depolama süresiyle beraber arttığı da belirlenmiştir. Elma suları numunelerinin hiçbirinin PAT düzeyi 50 µg/L'yi aşmamıştır. Ancak elma suyu konsantresi numunelerinden ikisinin PAT düzeyi 50 µg/L'nin üzerinde çıkmıştır. Ev yapımı elma sirkeli numunelerinin ise 4 tanesinin 50 µg/L'nin üstünde PAT içerdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda soğuk hava depolarında depolanan elmaların çürüyenleri düzenli olarak seçilip atılsa bile ortamda sürekli olarak bulunan PAT üreten küflerin kontaminasyonunun önüne geçilemediği, depolama süresi arttıkça ortamdaki kontaminasyonun artması nedeniyle elmalardaki PAT düzeylerinin de arttığı ve hatta sağlam görünen elmalara bile kontamine olabildiği tespit edilmiştir. Ticari olarak kullanılmak üzere üretilen elma ürünlerinde hasat sonrası depolanma ve işlenmesi süreçlerinin elma ve türevi olan gıdaların güvenilirliğini doğrudan etkilediği de böylece görülmektedir. Ayrıca ev yapımı elma sirkelerinin önemli PAT kaynakları olabileceği de çalışmamız ile ortaya çıkmış olup bu hususta ülkemizde daha önce yapılmış bir tez çalışması dışında çalışmaya da yapılan literatür taramasında rastlanılmamıştır. Elma sularında yasal limitin aşılmamış olması üretim prosesindeki ayıklama ve basınçlı su ile yıkamanın etkin şekilde yapılması ya da PAT düzeyini düşürücü teknik işlemler nedeniyle olabilir. Yine de konsantre elma sularında PAT

kontaminasyonunun hala bir sorun olduğu çalışmamızın sonuçları ile gösterilmiştir. Bu konuda evsel ve fabrikasyon üretim koşullarının nasıl olması gerektiği konusunda ilgilileri bilinçlendirme çalışmalarının ve yetkililerce de denetimlerin yapılması halk sağlığını koruma açısından son derece önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Aktaş, A. H., Yılmaz, M., ve Demirci, Ş. (2004). Determination of PAT in Apple Juice Produced in Isparta, Turkey by HPLC with Diode Array Detection. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(3), 228-231.
- Al-Hazmi, N. A. (2010). Determination of PAT and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 353-359.
- Appell, M., Dombink-Kurtzman, M. A., ve Kendra, D. F. (2009). Comparative study of PAT, ascladiol, and neoPAT by density functional theory. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 894(1-3), 23-31.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C., & Almedia, C. M. (2010). Occurrence of Patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*, 121(3), 653-658.
- Bayraç, C., ve Camızcı, G. (2019). Adsorptive removal of PAT from apple juice via sulfhydryl-terminated magnetic bead-based separation. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 413-422.
- Boukouvalas, J., ve Maltais, F. (1995). An efficient total synthesis of the antibiotic PAT. *Tetrahedron Letters*, 36(40), 7175-7176.
- Brandon, E. F., Baars, A. J., Te Biesebeek, J. D., Oomen, A. G., Bakker, M. I., ve De Heer, C. (2012). Risk assessment of PAT intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin Journal*, 5(4), 391-403.
- Clercq, N. D., Vlaemynck, G., Pamel, E. V., Weyenberg, S. V., Herman, L., Devlieghere, F., Coillie, E. V. (2016). Isoepoxydon dehydrogenase (idh) gene expression in relation to PAT production by *Penicillium expansum* under different temperature and atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 50-57.
- Collin S, Bodart E, Badot C, Bouseta A, Nizet S. 2008. Identification of the main degradation products of PAT generated through heat detoxication treatments. *J Inst Brew*. 114(2):167–171.
- Cunha, S. C., Faria, M. A., Pereira, V. L., Oliveira, T. M., Lima, A. C., ve Pinto, E. (2014). PAT assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*, 44, 185-190.
- Değirmen, Z. (2020). Paketli Glutensiz Ürünlerde Mikotoksin Varlığının Araştırılması. *Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 6.
- Dural, E. (2020). Monitorization of PAT and hydroxymethylfurfural in fruit juices and commercial fruity baby foods by an HPLC-DAD method. *REVUE ROUMAINE DE CHIMIE*, 65(2), 191-200.

- Dos Santos, I. D., Pizzutti, I. R., Dias, J. V., Fontana, M. E., Brackmann, A., Anese, R. O., . . . Cadroso, C. D. (2018). PAT Accumulation in Apples under Dynamic Controlled Atmosphere Storage. *Food Chemistry*, 255, 275-281.
- Fliege, R., ve Metzler, M. (2000). Electrophilic Properties of PAT. N-Acetylcysteine and Glutathione Adducts. *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 373-381.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., ve Marín, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiol*, 26(8), 757-769.
- Gökmen, V., ve Acar, J. (1998). Incidence of PAT in apple juice concentrates produced in Turkey. *Journal of Chromatography A*, 815, 99-102.
- Gökmen, V., ve Acar, J. (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and PAT in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 69-74.
- Gökmen, V., ve Acar, J. 2000. Long-term survey of PAT in apple juice concentrates produced in Turkey. *Food additives & contaminants* 17(11): 933-936.
- Gökmen, V., Artık, N., Acar, J., Kahraman, N., ve Poyrazoğlu, E. (2001). Effects of various clarification treatments on PAT, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *European Food Research and Technology*, 213, 194-199.
- Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237-247.
- Iqbal, S. Z., Malik, S., Asi, M. R., Selamet, J., ve Malik, N. (2018). Natural occurrence of PAT in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control*, 84, 370-374.
- Ioi, J. D., Zhou, T., Tsao, R., ve Marcone, M. (2017). Mitigation of PAT in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins*, 9(5), 157.
- İçli, N. (2019). Occurrence of PAT and 5-hydroxymethylfurfural in apple sour, which is a traditional product of Kastamonu, Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(6), 952-963.
- Kadalkal, Ç., Nas, S. (2003). Effect of Heat Treatment and Evaporation on Patulin and Some Other Properties of Apple Juice. *Science of Food and Agriculture*, 83(9), 987-990.
- Kadalkal, Ç., Nas, S., ve Ekinci, R. (2005). Ergosterol as a new quality parameter together with PAT in raw apple juice produced from decayed apples. *Food Chemistry*, 90, 95-100.
- Karadeniz, F., Ekşi, A., (1995). Elma suyu konsantrelerinde PAT miktarı ve değişkenliği. *Gıda Sanayii Dergisi* 39: 14-18.

- Koca, N., Ekşi, A. (2005). Reduction Of PAT In Apple Juice Concentrates During Storage. *Journal of Food Safety*, 25(1), 1-8.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., ve Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical and limitations. *Appl Microbiol Diotechnol*, 86, 1595-1612.
- Leggott, N. L., ve Shephard, G. S. (2001). Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*, 12(2), 73-76.
- Mahato, D. K., Kamle, M., Sharma, B., Pandhi, S., Devi, S., Dhawan, K., Kumar, P. (2021). PAT in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies. *Toxicon*, 198, 12-23.
- Marín, S., Mateo, E. M., Sanchis, V., Valle-Algarra, F. M., Ramos, A. J., ve Jiménez, M. (2011). PAT contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *Food Chemistry*, 124(2), 563-568.
- Moukas, A., Panagiotopoulou, V., ve Markaki, P. (2008). Determination of Patulin in Fruit Juices Using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chemistry*, 109(45), 860-867.
- Oskay, N. (2012). Meyve Sularında PAT Oluşumunun Araştırılması ve PATin Laktik Asit Bakterileri İle Detoksifikasyonu. *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Paimard, G., Mohammadi, R., Bahrami, R., Khosravi-Darani, K., Sarlak, Z., Rouhi, M. (2021). Detoxification of patulin from juice simulator and apple juice via cross-linked Se-chitosan/L-cysteine nanoparticles. *LWT*, 143, 111146.
- Ramalingam, S., Bahuguna, A., ve Kim, M. (2019). The effects of mycotoxin PAT on cells and cellular components. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 99-113.
- Ricelli, A., Baruzzi, F., Solfrizzo, M., Morea, M., Fanizzi, F. P. (2007). Biotransformation of PAT by *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 785-792.
- Ritieni, A. (2003). Patulin in Italian Commercial Apple Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6086-6096.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Sanchis, V., Viñas, I., Martín-Belloso, O., ve Soliva-Fortuny, R. (2020). Formation of PAT-glutathione conjugates induced by pulsed light: A tentative strategy for PAT degradation in apple juices. *Food Chemistry*, 315, 126283.
- Soldatkin, O. O., Stepurska, K. V., Arkhypova, V. M., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Lagarde, F., ve Dzyadevych, S. V. (2017). Conductometric enzyme biosensor for PAT determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 1010-1015.

- URL-1. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Kurum/24308110>, Erişim tarihi: 28/12/2021.
- Yang, C., Li, M., Peng, B. (2021). Transcriptomic analysis reveals the metabolic mechanism of PAT by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *LWT*, 111808.
- Yazıcı, Ş., ve Veliöğlü, S. (2002). Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the PAT content of apple juice concentrate. *Food/Nahrung*, 46(4), 256.
- Yuan, Y., Zhuang, H., Zhang, T., ve Liu, J. (2010). Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control*, 21(11), 1488-1491.
- Yurdun, T., Omurtag, G. Z., ve Ersoy, Ö. (2001). Indence of PAT in Apple Juices Marketed in Turkey. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1851-1853.
- Zaied, C., Abid, S., Hlel, W., ve Bacha, H. (2013). Occurence of Patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. *Food Control*, 31(2), 263-267.
- Zhang, Z., Zeng, C., ve Peng, B. (2019). Adsorption properties of magnetic carbon nanotubes for PAT removal from aqueous solution systems. *Food Control*, 102, 1-10.
- Zhao, G., Yang, X., Nisar, T., Tian, Y., Sun, L., Zhang, X., ve Guo, Y. (2018). PAT biodegradation and quality improvement of apple puree fermented with *Byssoschlamys nivea* FF1-2. *Food bioscience*, 21, 45-52.
- Zheng, X., Wei, W., Zhou, W., Li, H., Rao, S., Gao, L., Yang, Z. (2021). Prevention and detoxification of PAT in apple and its products: A review. *Food Research International*, 140, 110034.