

ÇİRİŞ OTUNUN (*Asphodelus aestivus*) ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Asphodelus aestivus*

Esmâ GÜZEL¹, Remzi BOĞA¹, Ercan BURSAL^{2,*}

¹Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 49100, Muş

²Muş Alparslan Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, 49100, Muş

Özet

Günümüzde antioksidanların gıda endüstrisinde kullanımı oldukça yaygın olup tükettiğimiz hazır gıdaların çoğuna gıda katkı maddesi olarak eklenirler. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakta olup onların raf ömürlerini uzatmaktadır. Antioksidanlar lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek serbest radikal ve lipid peroksidasyonunu önlerler. Serbest radikaller antioksidan moleküller tarafından giderilerek inaktif hale getirilirler. Bu çalışmanın amacı geleneksel Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) bitkisinin antioksidan etkisi araştırılmıştır. Çiriş otu sıcak ve soğuk su ekstraktlerinin radikal giderme aktivitesi DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi metoduna göre gerçekleştirildi. Ayrıca ekstraktlerin potasyum ferriksiyanit indirgeme (FRAP) metodu ile toplam indirgeme kuvveti çalışıldı.

Anahtar Kelimeler: *Çiriş otu, Asphodelus aestivus, Antioksidan aktivite, İndirgeme potansiyeli*

Abstract

Nowadays, antioxidants are commonly being used on food industry as food additives for many prepared food. They are lengthened the time of using food. Antioxidants protect lipid peroxidation chain reactions that can produce free radicals and lipid peroxides. Free radicals can be deactivated and scavenged by antioxidant compounds. The purpose of this study was to determine the antioxidant and antiradical capabilities of water extracts of *Asphodelus Aestivus*, that used commonly in Turkish traditional cookery. The hot and cold water extracts of *Asphodelus Aestivus* were evaluated for their radical scavenging activity by means of the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical scavenging assay. Also, reducing power activities of extracts were evaluated by means of FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay.

Keywords: *Asphodelus aestivus; Reducing power; Antioxidant activities*

* Sorumlu Yazar/Corresponding author: Ercan BURSAL, Muş Alparslan Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, 49100, Muş, Tel: 00904362494949, e.bursal@alparslan.edu.tr

1. GİRİŞ

Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren atomik veya moleküler yapıdaki maddelerdir. Radikaller eşleşmemiş elektronlarından dolayı kimyasal olarak çok aktifler ve ortamdaki diğer biyolojik moleküllere saldırarak onların biyolojik yapılarını bozarlar. Bu radikal ve reaktif ürünler nükleik asitler, proteinler ve lipitleri okside ederek, kimyasal yapılarını bozarlar ve metabolizmalarında olumsuz neticeler oluşturabilirler [1]. Canlı sistemlerde serbest radikallerin varlığı gayet normal olup, elektron transferi, biyosinyal üretimi ve makrofaalarda bakterilerin yok edilmesi gibi pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Buna karşın bu radikal ve reaktiflerin canlıda yüksek miktarda bulunması biyomoleküllerin oksidasyonu sonucunda doku hasarı, hücre ölümü, erken yaşlılık, kanser, kalp damar hastalıkları ve nörolojik bozukluklar gibi zararlı süreçlere sebep olmaktadır [2].

Metabolizmadaki serbest radikaller, reaktif oksijen türlerinden oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin oluşma kaynakları ise elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik kaynaklar ve UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, beslenme, kanserojen maddeler gibi dış kaynaklardır [3,4].

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidan maddeler bu radikal ve reaktif ürünleri gidererek olumsuz etkilerini inhibe ederler [5,6].

Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Canlılarda antioksidan savunma sistemi iki ana gruba ayrılır. Bunlar; metabolizmada üretilen (endojen) ve dışarıdan diyet ile alınan (ekzojen) antioksidan sistemleridir. Endojen antioksidan sistemi, antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştırıcı proteazlar ve fosfolipaz gibi enzimler, yeni bileşikler sentezleyen sistemler, glutatyon, ürik asit ve çeşitli metal bağlayıcılarından oluşmaktadır [4].

Ekzojen antioksidanlar ise sentetik ve doğal olarak iki şekilde mevcuttur. Sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütillhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve troloks gibi maddelerdir. Sentetik antioksidanlar gıdalarda; gıdaların oksidasyonu sonucu oluşan bozulmalar, koku oluşumu, tatların bozulması ve vitamin miktarındaki azalmaları gibi oluşan problemleri çözmede ve bunların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalardan sonra kullanımlarına ciddi sınırlama ve yasaklar getirilmiştir [7].

Doğal antioksidanlar en çok yeşil sebzelerde, tohumlarda, baklagiller ve meyvelerde bulunur. Kivi (*Actinidia deliciosa*) [4], lavanta [8], karanfil [9], rezene [10], karnabahar [11], nane [12], defne [13], domates (*Lycopersicon esculentum*) [14] ve anason [15] gibi bitkilerin antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir.

Çiriş otu, *Asphodelaceae* familyasından *Asphodelus* cinsini oluşturan bitki türlerinin

ortak adıdır. İlkbaharda yüksek dağlarda yetişen bu bitkinin topraktan çıkan yeşil yaprakları kesilerek toplanan çiriş otu sebze olarak çarşı pazarlarda yerini almaktadır. Çok farklı yemekleri yapılarak mevsiminde sıkça tüketilmektedir. Kendine has bir kokusu vardır. Birçok bölgede yetişen çirişin pek çok hastalığa karşı iyileştirici yönü olduğuna inanılır [16,17]. Son yıllarda gittikçe önem kazanan doğal antioksidan kaynaklarının belirlenmesi ve farmasötik özelliklerinin tespiti çalışmalarına katkısı olabilmesi bakımından bu bitkinin antioksidan kapasitesini çeşitli in vitro metotlar ile belirlemek amaçlanmıştır [18,19].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Antioksidan kapasite belirleme için yapılan metotlarda kullanılmak üzere; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) radikali Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Na_2HPO_4 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, TCA (Triklor asetik asit), FeCl_3 , etanol ve saf su Muş Alparslan Üniversitesi Kimya Bölümü Laboratuvarından temin edildi.

2.1. Çiriş Otu (*Asphodelus Aestivus*) Su Ekstrelerinin Hazırlanması

Antioksidanlar ile ilgili çalışmalarda kullanılan çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) yaprak kısmından 200 g tartılıp, blender (parçalayıcı) cihazı ile parçalandı. Çiriş otu oda sıcaklığı su ekstresinin (ÇOE) hazırlanması için blendırda parçalanmış 100 gram numune üzerine 200 ml saf su ilave edildi. Bir gün boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra karışım tülbent bezinden süzülerek ve geriye kalan posa tekrar 100 ml saf su ile aynı şartlarda ekstrakte edilmeye devam edildi ve tülbent bezinden süzüldü. Ekstreler birleştirildikten sonra süzgeç kâğıdından süzülerek, süzüntüler balonlara alındı ve derin dondurucuda donduruldu. Dondurulmuş ekstreler 50 mm-Hg basınç altında liyofilizatörde kuruluğa kadar liyofilize edildi.

Çiriş otu kaynatılmış su ekstresinin (ÇKE) hazırlanması için blendırda parçalanmış 100 gram numune üzerine 200 ml saf su ilave edildi. 15 dakika boyunca 100 °C sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra karışım tülbent bezinden süzülerek ve geriye kalan posa tekrar 100 ml saf su ile aynı şartlarda ekstrakte edilmeye devam edildi ve tülbent bezinden süzüldü. Ekstreler birleştirildikten sonra süzgeç kâğıdından süzülerek, süzüntüler balonlara alındı ve derin dondurucuda donduruldu. Dondurulmuş ekstreler 50 mm-Hg basınç altında liyofilizatörde kuruluğa kadar liyofilize edildi.

2.2. Toplam İndirgeme Kapasitesi

Çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) liyofilize su ekstrelerinin toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu (1986) yöntemine göre yapıldı. Bunun için daha önce hazırlanmış olan stok çözelti kullanıldı. Bu stok çözeltinin farklı konsantrasyonları alınarak deney tüplerine aktarıldı ve hacim saf suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] ilave edildi ve karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına

2,5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 ml alındı ve bunun üzerine 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0,5 ml FeCl₃ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak saf su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine saf su kullanıldı [7].

2.3. DPPH[•] Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) liyofilize su ekstralarının DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitesi Blois metodunun (1958) bir modifikasyonuna [7] göre yapıldı. Serbest radikal olarak 1 mM'lık DPPH[•] çözeltisi kullanıldı. Numune olarak indirgeme kuvvetlerinde kullanılan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla değişik konsantrasyonlarda çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde destile etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH[•] çözeltisinden 1 ml ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak 3 ml etanol ve 1 ml DPPH[•] çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH[•] çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir.

3. BULGULAR

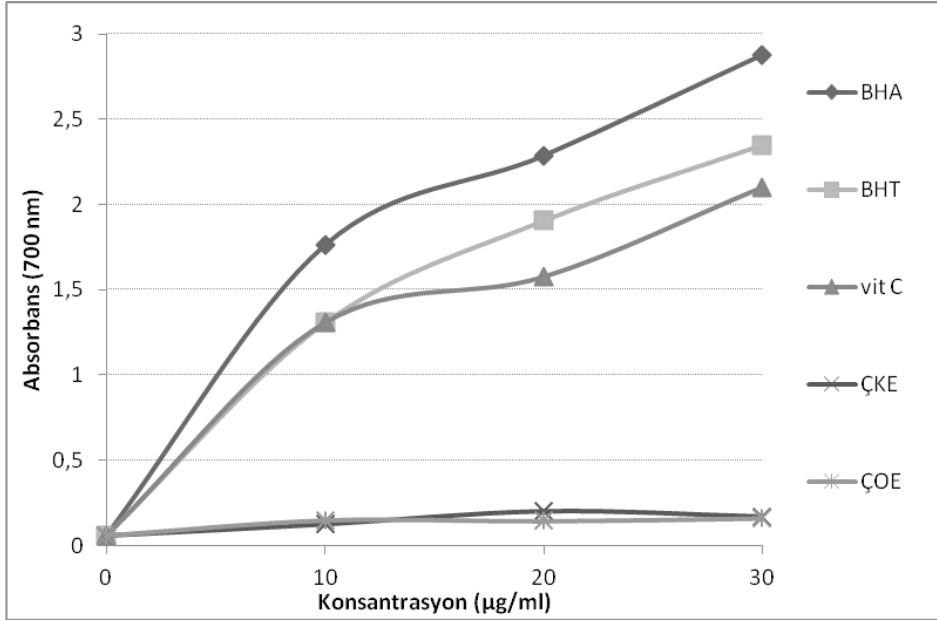
Antioksidan aktivite tayin metotları; gıda, ilaç veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla DPPH[•], ABTS^{•+} ve O₂^{•-} radikal giderme aktiviteleri, metal şelatlama kapasitesi, total indirgeme kapasitesinin araştırılması gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır [4]. Bu çalışmada da bu metotlardan DPPH[•] radikal giderme aktivitesi ve total indirgeme kapasite tayini kullanıldı. Bulgular BHA, BHT ve askorbik asit gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

3.1. Total İndirgenme Kapasitesi

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir [4].

Çalışmada kullanılan çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) kaynatılmış su ekstresi (ÇKE) ve çiriş otu oda sıcaklığı su ekstresinin (ÇOE) indirgeme kapasitelerinin de standart antioksidanlar gibi artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Fakat bu artmanın standart antioksidanlar kadar belirgin ve anlamlı olmadığı Şekil 3.1'den anlaşılmaktadır. Ekstrelerin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/

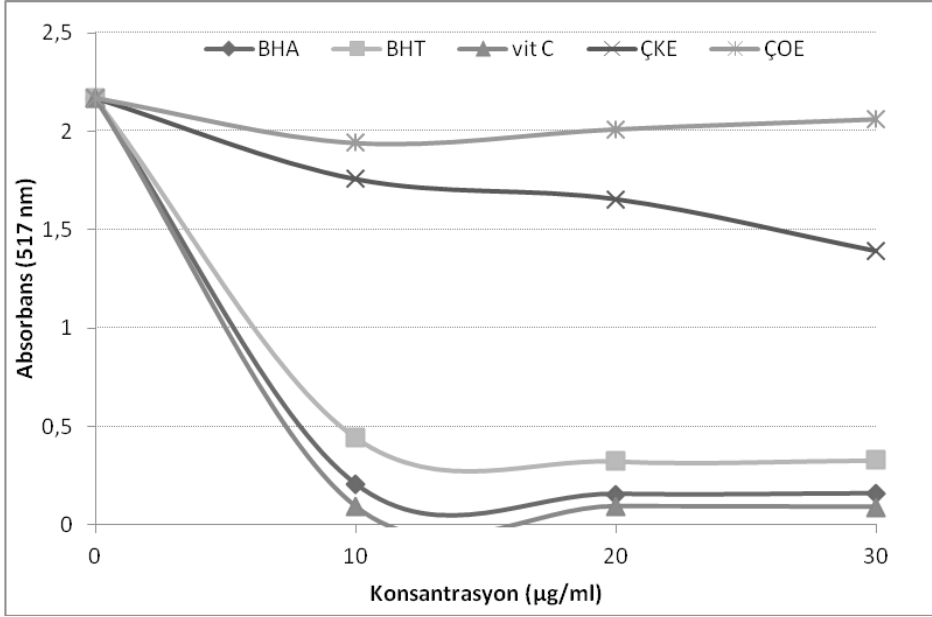
ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çiriş otu kaynatılmış su ekstresi (ÇKE) ve Çiriş otu oda sıcaklığı su ekstresinin (ÇOE) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması

3.2. DPPH• Serbest Radikali Giderme Aktivitesi İle İlgili Çalışma Bulguları

DPPH• radikali giderme aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda 517 nm'de azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltileri miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir. Çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) su ekstraktlarının standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit kadar yüksek DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi sergilemediği fakat kaynatılmış ekstrenin fark edilir derecede soğuk su ekstresinden çok fazla etkili olduğu Şekil 3.2'deki bulgulardan görülmektedir.



Şekil 3.2. Çiriş otu kaynatılmış su ekstresi (ÇKE) ve Çiriş otu oda sıcaklığı su ekstresinin (ÇOE) farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması

DPPH• radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı. Burada A_{Numune} DPPH• radikali çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $A_{Kontrol}$ ise sadece DPPH• radikali çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT ve askorbik asit kullanıldı.

$$\text{DPPH} \cdot \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{Numune}}{A_{Kontrol}} \right) \times 100$$

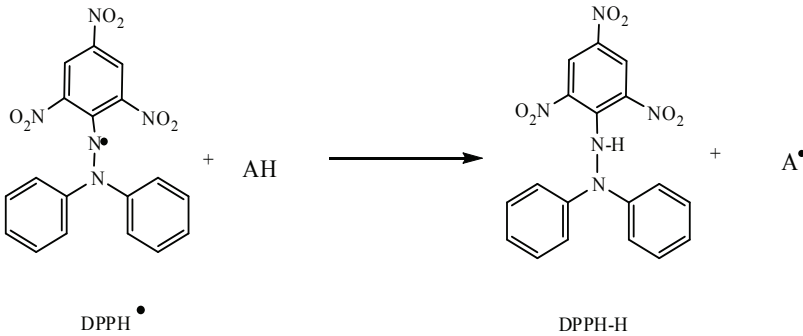
Çiriş otu su ekstraktları ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla askorbik asit > BHA > BHT > ÇKE > ÇOE şeklinde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Bu değerler yine sırasıyla %95.8 > %93.1 > %84.9 > %35.8 > %5.0 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre çiriş otu kaynatılmış su ekstresi orta derecede serbest radikal gideren doğal bir antioksidan kaynağıdır.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıp, gıda ve eczacılık sektörlerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri çok önemlidir. Çeşitli nedenlerle serbest radikaller meydana gelmekte ve dolayısıyla eczacılık ve gıda sanayinde lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir. Son zamanlarda sentetik serbest radikallerin giderilmesi ile ilgili birçok metot geliştirilmiştir. Bunların başında total indirgenme kapasitesi, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺ giderme aktivitesi, DMPD⁺ giderme aktivitesi, PMS-NADH-NBT sistemi, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ve riboflavin-metiyonin-ışık sistemi gibi sistemlerde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi radikal giderme metotları kullanılmaktadır. Bu kromojen radikal giderme metotları uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajlardan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [4]. Bu çalışmamızda yukarıda belirtilen metotlardan ikisi DPPH radikal giderme aktivitesi ve total indirgenme kapasitesi kullanılmıştır.

Total indirgenme kapasitesi metodu, antioksidan maddelerin indirgeyici özelliklerinin olabilmesi esasına dayanmaktadır. İndirgeyici antioksidanlar, oksidan maddeleri indirgeyerek bunların zararlı etkilerini inhibe ederler. Bu çalışmada çiriş otu (*Asphodelus aestivus*) su ekstraktının standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit kadar yüksek DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi sergilemediği fakat kaynatılmış ekstreinin fark edilir derecede soğuk su ekstrelerinden çok fazla etkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer bitki kaynaklarına göre rezene [10], karnabahar [11], nane [12], defne [13] daha düşük aktiviteler tespit edilmiş olup sonraki çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

DPPH radikal giderme aktivitesi metodunda kullanılan radikal DPPH• (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) 517 nm'de absorpsiyon veren organik yapıda olan bir maddedir. Bu radikal antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek, radikal olmayan DPPH-H molekülüne dönüşmektedir. DPPH-H molekülü 517 nm'de absorpsiyon vermediği için azalan absorpsiyon miktarından antioksidan aktivite hesaplanabilir.



Şekil 3.3. DPPH• radikalinin bir antioksidan tarafından giderilmesi

Çiriş otu su ekstreleri ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla askorbik asit > BHA > BHT > ÇKE > ÇOE şeklinde DPPH' radikalı giderme aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Bu değerler yine sırasıyla %95.8 > %93.1 > %84.9 > %35.8 > %5.0 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre çiriş otu kaynatılmış su ekstresi orta derecede serbest radikal gideren doğal bir antioksidan kaynağıdır.

KAYNAKÇA

- [1]. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Mimosa Yayınları*, Konya, 1995.
- [2]. Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O., Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier Science B.V. 2000.
- [3]. Aksoy, Y., Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. T Klin Tıp Bilimleri, 22, 442-448, 2002.
- [4]. Bursal, E., Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye, 2009.
- [5]. Halliwell, B., Free radicals and antioxidants:a personel view.Nutritional Review,52,253-265, 1994.
- [6]. Halliwell, B., Antioxidant in human health and disease.Annual Review of Nutrition.16.33-50, 1996.
- [7]. Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C., Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. Food Research International 51, 66-74, 2013.
- [8]. Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds an lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, 87, 393, 2004a.
- [9]. Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563, 2004b.
- [10]. Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R.. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563, 2004a.
- [11]. Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), Italian Journal of Food Sciences, 16, 17-30, 2004b.
- [12]. Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., Antioxidant activity of different parts of isgın (*Rheum ribes* L.). Asian Journal of Chemistry, 19, 3047-3055, 2007.
- [13]. Köksal, E., Purification and characterisation of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) and determination of their antioxidant and antiradical

- activities. PhD Thesis, Atatürk University, Erzurum, Turkey, 2007.
- [14]. Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148, 2005.
- [15]. Elmastas, M., Türkekul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448, 2006.
- [16]. Guerrero, J.L., Fuentes, M.M., Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 123-129, 2008.
- [17]. Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382, 2003.
- [18]. Baytop, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1999.
- [19]. Peksel, A., İmamoğlu, S., Antioxidative properties of extracts from *Asphodelus aestivus* brot (Liliaceae), *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55:596-596, 2009.