

BAZI YERLİ ELMA ÇEŞİTLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ELMA AĞACI YAPRAKLARININ KSILANAZ ÜRETİMİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Didem Sutay Kocabaş^{1*}, Eren Tur¹, Aytaç Kocabaş²

¹Gıda Mühendisliği Bölümü, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman, Türkiye

²Biyoloji Bölümü, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 21.01.2015

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 09.03.2015

Kabul tarihi / Accepted: 11.03.2015

Özet

Bu çalışmada, Golden delicious, Red delicious ve Granny smith elma çeşitlerinin sulu özüt bileşimleri gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) tekniğiyle belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite Red delicious elma kabuğunda (3.32 ± 0.34 mg/ml EC₅₀ değeri), buna karşılık gelen toplam fenolik içeriği (754.4 ± 43.3 mg GAE/100 g kuru ağırlık) ile belirlenmiştir. En yüksek protein içeriği (2.09 ± 0.07) ise Granny smith elma kabuğunda tespit edilmiştir. Granny smith elmaların bir diğer üstün özelliği de, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyel aktivitedir. Genel olarak, kabuklardaki protein konsantrasyonu etli kısımlara göre %36 daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, elma ağacı yaprakları kullanılarak katma değerli bir ürün (ksilanaz) üretimi atık değerlendirme yaklaşımıyla incelenmiştir. En yüksek enzim üretimi (64.7 ± 5.3 IU/ml) Red delicious elma ağacı yaprakları kullanılarak elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Elma, antioksidan aktivite, antimikrobiyel aktivite, atık biyokütle, ksilanaz

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF SOME NATIVE APPLE VARIETIES AND VALORIZATION OF APPLE TREE LEAVES FOR XYLANASE PRODUCTION

Abstract

In this study, the water extract compositions of Golden Delicious, Red Delicious and Granny Smith apple varieties were determined by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) technique. The highest antioxidant activity was determined in the peels of the Red delicious apples (EC₅₀ of 3.32 ± 0.34 mg/ml) with a corresponding total phenolic content of 754.4 ± 43.3 mg GAE/100 g dry weight. The highest protein content ($2.09 \pm 0.07\%$) was detected in the peels of Granny Smith apples. Another superior property of Granny smith apples was the antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. In general, protein concentrations in the peels were found 36% higher than the fleshy parts. In addition, a value-added product (xylanase) production was investigated by utilizing apple tree leaves with the waste-valorization approach. The highest enzyme production (64.7 ± 5.3 IU/ml) was obtained by utilizing the leaves of Red delicious apple tree.

Keywords: Apple, antioxidant activity, antimicrobial activity, waste biomass, xylanase

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ didemkocabas@kmu.edu.tr, ☎ (+90) 338 226 2000/5008,

☎ (+90) 338 226 2214

GİRİŞ

Endüstriyel açıdan gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar ve kanser ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu hastalıkların diyetle olan yakın ilişkisi yıllardır araştırmalara konu olmuştur (1, 2). İlerleyen yaşa bağlı birçok hastalığın serbest radikallerin hücreler üzerindeki yıkıcı etkileri nedeniyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu durum, hastalıklardan korunmak için antioksidanların diyetimizin önemli bir parçası olduğunu göstermektedir (3). Fenolik bileşikler güçlü antioksidanlardır ve bu özellikleri nedeniyle oksidatif yıkım sonucu oluşan hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptirler (4). Flavonoidler, sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan fenolik antioksidanlardır ve yaşlı erkeklerde kalp hastalıkları nedeniyle ölüm riskini azaltıcı yönde etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (5). Bir flavonoid çeşidi olan kuersetin alımının da akciğer kanseri görülme oranı ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir (6). Son dönemde, fenolik bileşiklerin kanser metastazına karşı potansiyel etkileri konusunda çalışmalar da araştırmacıların ilgisini çekmektedir (4).

Elma kolay ulaşılabilen bir fenolik kaynağıdır. Elma ayrıca monosakkaritler, mineraller, lifler ve diğer birçok biyoaktif bileşikler açısından da zengindir (7). Türkiye, dünyada bu değerli meyveyi en çok üreten ülkeler arasında olup, ülkemizin 2013 yılı elma üretim miktarı 3.1 milyon tonun üzerindedir. Elma üretimine paralel olarak, meyve suyuna işlenen meyveler arasında da elma ile sıralardadır (8). Türkiye’de elma üretiminde lider il, Isparta’dır ve bunu Karaman takip etmektedir. Ülkemizde üretilen elmaların yaklaşık yarısının Red delicious ve üçte birinin de Golden delicious olduğu bilinmektedir.

Ülkemizde ve tüm dünyada yüksek miktarda tüketilen bir meyve olan elmanın üretimi sonucunda her yıl çok yüksek miktarlarda elma ağacı yaprağı elde edilmektedir. Ağacın yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan yapraklar, sonbahardaki hasat mevsiminden sonra işlevini yitirmektedir. Atık olan bu yapraklar katma değerli ürünlerin üretilmesi için kullanılabilir çünkü ağaç yaprakları karbonhidratlar, proteinler, enzimler, lipitler ve fenolik bileşikler gibi birçok önemli bileşeni içeren zengin ve yenilenebilir kaynaklardır. Yapraklar, yenilenebilirlik özellikleri nedeniyle biyorafineriler için dikkat çeken ham maddelerdir. Biyorafinerilerde ağaç yaprakları katma değerli ürünlere, biyoyakıtlara

ve biyoenerjiye dönüştürülebilir. Bu yaklaşım, doğanın korunması ve insanlığın artan ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için oldukça önemlidir (9, 10).

Lignoselülitik enzimler de biyorafinerilerde hem üretilen hem de hidroliz basamaklarında kullanılan endüstriyel açıdan önemli enzimlerdir. Ksilanazlar lignoselülitik enzim grubundadır ve kağıt endüstrisinde kağıt hamurunun beyazlatılması, kağıt hamurundan mürekkep giderimi, gıda endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılması ve yoğunluğunun azaltılması, fırıncılıkta hamur kalitesinin artırılması, yem endüstrisinde yem sindirilebilirliğinin artırılması ve tekstil endüstrisinde ürünlerin yumuşatılması gibi oldukça geniş bir endüstriyel kullanım alanına sahiptir (11).

Enzim üretimi için yeni kaynakların bulunması ve düşük maliyetli süreçlerin geliştirilmesi ekonomik açıdan önem taşımaktadır. Süreç işletim maliyetinin düşürülmesi için atık lignoselülitik kaynaklar değerlendirilebilir (12). Bu noktadan hareketle, süreç işletim maliyetinin düşürülmesi için lignoselülitik doğaya sahip atık elma ağacı yapraklarının kullanılması, atık biyokütleden katma değeri yüksek ürünlerin eldesi için kritik bir konudur.

Bu çalışmanın amacı, yaygın şekilde üretilen ve tüketilen seçilmiş elma çeşitlerinin (Golden delicious, Red delicious ve Granny smith) kimyasal bileşimleri, antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri ile toplam fenolik ve protein içeriklerinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. Çalışmalarda elmaların kabuk ve etli kısımları ayrı ayrı incelenmiştir. Ek olarak, ekonomik değeri olmayan atık elma ağacı yapraklarının mikrobiyel ksilanaz üretiminde alternatif kaybon kaynağı olarak kullanılma potansiyeli biyorafineri perspektifiyle incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Elma Örneklerinin Temini ve Hazırlanması

Çalışmada, Golden delicious, Red delicious ve Granny smith elmaları kullanılmıştır. Elma örnekleri Karaman ili elma yetiştiricilerinden eylül ve ekim aylarında temin edilmiş ve kullanılmadan önce +4 °C’de en fazla 2 gün bekletilmiştir. Üreticiden alınan elma örnekleri yıkanmış, oda sıcaklığında kurutulmuş ve elma soyma aleti ile soyulmuştur. Çekirdek çıkarma işleminden sonra kalan etli kısım 5 mm kalınlığında dairesel şekilde dilimlenmiş ve her bir dilim 8 eşit parçaya bölünmüştür. Enzimatik

karamaya engel olmak için, örnekler hazırlandıktan hemen sonra 60 °C'deki sıcak hava sirkülasyonlu fırında (Biosan, Türkiye) kurutulmuştur. Kuru örnekler Waring blender ile toz haline getirilmiş ve elenerek partikül büyüklükleri standardize edilmiştir. Enzim üretimi için kullanılan elma ağacı yaprakları da yine Karaman elma yetiştiricilerinden hasat zamanında alınmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

Sulu Özütlerin Eldesi

Özütleme için toz haline getirilmiş örneklerden 10 g tartılarak 275 ml saf su ile karıştırılmış ve altı gözlü Sokslet sistemi (Termal, Türkiye) ile 48 saat boyunca paralel şekilde özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda elde edilen özütler, döner kurutucuda (IKA, Almanya) konsantre edilmiş ve işlem sonunda +4 °C'de saklanmıştır.

GC-MS İle Kimyasal Kompozisyon Analizi

Özütlerin GC-MS analizi Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, ABD) cihazında Agilent 5975C kütle seçici dedektör ile gerçekleştirilmiştir. GC sisteminde Agilent HP-5 kapiler kolonu (30 m uzunluk, 0.25 mm i.d., 0.25 mikron film kalınlığı) kullanılmıştır. Örnekler etanol ile seyreltilerek konsantrasyonları 10 mg özüt/ml değerinde sabitlenmiş ve sisteme 1 µl hacimde enjekte edilmiştir. Enjeksiyon ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 240 ve 280 °C olarak ayarlanmıştır. Kolon başlangıç sıcaklığı 60 °C'dir ve bu sıcaklıkta 5 dakika bekletilmiştir. Ardından sıcaklık 4 °C/dakika hızla 160 °C'ye getirilmiş ve son olarak 15 °C/dakika hızla 160 °C'den 240 °C'ye çıkarılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dakika sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. Sonuçlar iki paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesi için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ile serbest radikal süpürme aktivite tayini gerçekleştirilmiştir (13, 14). DPPH solüsyonu (0.06 M) metanolde hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda özütler hazırlanmış ve özütlerin 20 µl'si ile 180 µl DPPH karıştırılmıştır. Karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda absorbans değerleri 517 nm'de spektrofotometrede (Hach, ABD) ölçülmüştür. Örneklerin antioksidan aktivite tayini için DPPH inhibisyonu (%) Eşitlik.1'e göre hesaplanmıştır. Elde edilen DPPH inhibisyon verileri örnek konsantrasyonuna karşı grafiğe

geçirilmiş, grafik denklemi kullanılarak, başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli olan örnek konsantrasyonu (EC50) hesaplanmıştır.

$$DPPH \text{ inhibisyonu (\%)} = \frac{Abs_{\text{Kontrol}} - Abs_{\text{Örnek}}}{Abs_{\text{Kontrol}}} \times 100 \quad (1)$$

Antimikrobiyel Aktivitenin Belirlenmesi

Özütlerin antimikrobiyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir (15). Test organizması olarak Gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*) ve Gram negatif (*Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*) bakteriler kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Mueller-Hinton besiyerinde 35 °C veya 28 °C'de 24 saatte çoğaltılmıştır. Hücre yoğunlukları 0.5 Mc Farland standardına karşı ayarlanmıştır. Hücre süspansiyonlarından 100 µl alınarak Mueller-Hilton agar üzerine yayma plak yöntemiyle ekilmiştir. Boş disklere 40 µl özüt emdirilerek agar üzerinde üç paralel şekilde test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak penisilin, gentamisin ve tetrasiklin antibiyotik diskleri, negatif kontrol olarak ise saf su kullanılmıştır. Antimikrobiyel aktivitelerin tespiti için, gece boyunca yapılan inkübasyon sonunda özüt diskleri etrafındaki inhibisyon zonları ölçülmüştür.

Toplam Fenolik Miktarının Belirlenmesi

Özütlerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi ile kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Özüt örneğinden 1 ml alınarak 1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ve 1 ml doymuş sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisiyle karıştırılmıştır. Karışımın hacmi saf su ile 10 ml'ye ayarlanmıştır. Karışım 10 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda absorbans değerleri spektrofotometrede (Hach, ABD) 725 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart fenolik olarak gallik asit kullanılmış ve toplam fenolik içerikleri mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Protein içeriğinin belirlenmesi için azot tayini yöntemi kullanılmıştır. Toz halindeki örneklerdeki toplam azot miktarı Dumas azot analiz cihazında (VELP Scientifica, İtalya) kantitatif olarak tespit edilmiştir. Toz örneklerin analizi için 100 mg numune ile çalışılmış ve her bir örnek için iki paralel analiz gerçekleştirilerek ortalama değerler hesaplanmıştır. Çalışmada O₂ faktörü (ml O₂/mg örnek) ve O₂ akış hızı (ml O₂/dakika) sırasıyla

1.6 ve 400 olarak seçilmiştir. Protein içeriği, uygun çarpım faktörü (6.25) kullanılarak hesaplanmıştır.

Mikrobiyel Enzim Üretim Koşulları

Enzim üretimi için termofilik bir küf olan ve ksilanaz üretim yeteneğine sahip olduğu bilinen *Scytalidium thermophilum* (*Humicola insolens*, ATCC no. 16454) ile çalışılmıştır. Mikroorganizmanın kültür koşulları daha önce raporlandığı (16) şekilde olup, bu çalışmada karbon kaynağı olarak elma ağacı yaprakları kullanılmıştır. Elma ağacı yaprakları 60 °C sıcaklıktaki sıcak hava sirkülasyonlu fırında (Biosan, Türkiye) sabit tartıma kadar kurutulmuştur. Kuru yapraklar blender ile parçalanmış ve parçacık büyüklüğü 2 mm'den küçük olacak şekilde elenmiştir. Hazırlanan yapraklar kültür ortamına %2 (a/h) oranında eklenerek karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Kültür ortamından günlük numuneler alınmış, Whatman no. 1 filtre kağıdından süzöldükten sonra 10000 rcf'te 10 dakika boyunca santrifüjlenerek ksilanaz aktivitesi açısından incelenmiştir.

Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Ksilanaz aktivitesi, ksilan yıkımı sonucu açığa çıkan indirgen şekerlerin ölçülmesi prensibine dayanan 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle belirlenmiştir (17). Substrat olarak kayın ağacı ksilanı %1.0 (a/h) konsantrasyonunda 50 mM pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda çözödürülerek kullanılmıştır (18). Tepkime ve spektrofotometrik veri toplama koşulları daha önce raporlanan şekilde gerçekleştirilmiştir (16). Bir birim ksilanaz aktivitesi (IU/ml), belirli tepkime koşullarında dakikada 1 µmol ksiloz açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

GC-MS İle Kimyasal Kompozisyon Analizi

Analiz edilen örneklerin konsantrasyonları (10 mg özüt/ml) sabit olduğundan, kimyasal kompozisyonları GC-MS spektrumundaki pik alan değerleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen pikler, yazılımda mevcut olan kütüphanelerdeki verilerle eşleştirilmiştir. Örneklerdeki pik alan değerleri (%) ve kütüphanelerde eşleşen bileşikler Çizelge 1'de verilmiştir. GC-MS analizi ile tüm örneklerde 12 temel bileşen tespit edilmiştir. Tüm elma özüt örneklerinde mevcut olan ve HMF olarak bilinen 2-furankarboksaldehit,

5-(hidroksimetil), genellikle şekerlerin dehidrasyonu sonucu açığa çıkan ve fırınlanmış ürünlerde sık görülen bir bileşiktir. HMF'nin varlığının muhtemel nedeni de elma örneklerinin 60 °C sıcaklıkta kurutulmasıdır. 2-propanon,1,3-dihidroksi-bileşiğine ise en çok Red delicious elmada rastlanmıştır. Bu bileşiğin şekerleme ve dondurmalarda aroma katkısı olarak kullanıldığı bilinmektedir (19). Analiz sonucu tespit edilen bir diğer aroma bileşeni olan oktanolik asit-2-amino-, oktanolik asit olarak da bilinmektedir ve en çok Golden delicious elmaların etli kısmında bulunmuştur. Golden delicious elma kabuğunda en yüksek konsantrasyonda tespit edilen 3-büten-2-ol de bir aroma bileşiğidir ve genellikle alkolsüz içeceklerde, yumuşak şekerlemelerde ve pudinglerde kullanılmaktadır (20). 4H-piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil bileşiğinin antienflamatuvar ve antimikrobiyel özelliği olduğu bilinmektedir (21). Ayrıca, glukoz ve glisinin Maillard tepkime ürünü olduğu bildirilen bu bileşiğin antikanser aktivitesi de söz konusudur (22). Bu çok özellikli bileşik en yüksek miktarda Golden delicious elmanın etli ve kabuk kısımlarında, diğer elma tiplerine oranla 2 kata yakın yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir.

Antimikrobiyel Aktivite

Test edilen 6 farklı örnek arasında Granny smith etli kısım özütlerinin geniş bir aralıkta antimikrobiyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). *E. coli* dışında kalan diğer 4 mikroorganizmanın çoğalması bu özütle engellenebilmiştir. Bunun yanı sıra, antibiyotige (penisilin) dirençli bir *A. tumefaciens* kullanılmasına rağmen, bu mikroorganizmanın Granny smith etli kısım özütü ile inhibe edilebildiği gözlemlenmiştir. Granny smith dışında, Golden delicious kabuk ve Red delicious etli kısım özütleri de *S. aureus*'un çoğalmasını engellemiştir.

Alberto vd. (2006) üç bileşenli solvent sistemi kullanarak Granny smith ve Royal gala tip elmalardan özütleme gerçekleştirmiş ve özütlerin antimikrobiyel aktivitelerini incelemişlerdir (23). Çalışmada 3 farklı *E. coli* suşu ve 2 farklı *S. aureus* suşu kullanmışlardır. En geniş inhibisyon zonu değerini (10 mm), aseton:su:asetik asit solvent sistemi kullanarak elde ettikleri Granny smith tip elmaların kabuk özütleriyle tespit etmişlerdir. Bunun yanında, diğer solvent sistemleri ile elde edilen Granny smith özütleri ise 3 ve 1 mm inhibisyon zonu sağlamışlardır. Benzer şekilde,

Çizelge 1. GC-MS analiz sonuçları
Table 1. Results of GC-MS analysis

Bileşik ismi (Compound name)	Alıkonma zamanı (dakika) (Retention time) (min)	Molekül formülü (Molecular formula)	Pik alanı (Peak area) (%)					
			Golden delicious		Granny smith		Red delicious	
			Etili (Flesh)	Kabuk (Peel)	Etili (Flesh)	Kabuk (Peel)	Etili (Flesh)	Kabuk (Peel)
2-2'-bioksiran (R*,R*)-(±)-propanal, 2,3-dihidroksi-	4.803-4.814	C ₄ H ₆ O ₂	4.97	8.54	0.40	0.84	4.51	0.56
2-propanon, 1,3-dihidroksi-	6.446-6.457	C ₃ H ₆ O ₃	1.96	2.95	0.28	0.12	2.02	0.43
1,2-siklo pentandion	8.425-8.445	C ₃ H ₁₀ O ₃	7.41	7.40	13.69	19.04	16.40	21.94
formik asit, 2-propenil ester-	9.645-9.651	C ₅ H ₆ O ₂	5.01	9.12	0.37	0.62	4.47	6.64
oktanoik asit-2-amino-	12.048-12.239	C ₄ H ₆ O ₂	6.36	13.08	8.38	13.36	12.05	15.00
D-alanin N-pro pargiloksi karbonil-izoheksil ester	14.022-14.026	C ₈ H ₁₇ NO ₂	3.56	0.51	0.28	0.32	0.27	0.29
3-büten-2-ol	15.379-15.496	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	14.75	16.83	11.15	10.82	9.45	9.84
etanamin-N-etil-N-nitroso	16.068-16.071	C ₄ H ₈ O	2.39	3.95	0.24	0.36	0.28	0.36
4H-piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil	17.527-17.545	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	2.16	3.04	0.17	0.18	0.15	0.23
2-furankarboksaldehit, 5-(hidroksimetil)	17.823-17.892	C ₆ H ₈ O ₄	13.82	18.75	7.05	8.76	8.08	6.81
1,3-Dioksolan, 4-[(2-metoksi-4-oktadesenil)oksi]metil)-2-2-dimetil-	20.864-21.001	C ₆ H ₆ O ₃	34.15	37.34	45.54	38.41	39.46	32.01
	26.528-26.543	C ₂₅ H ₄₈ O ₄	3.46	8.48	3.46	7.16	2.86	5.89

Çizelge 2. Elma özütlerinin antimikrobiyel aktiviteleri
Table 2. Antimicrobial activities of apple extracts

Örnek (Sample)	İnhibisyon zonu (Inhibition zone) (mm)				
	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.tumefaciens</i>
Golden delicious	Kabuk (Peel)	-	-	6	-
	Etili kısım (Flesh)	-	-	-	-
Red delicious	Kabuk (Peel)	-	-	-	-
	Etili kısım (Flesh)	-	-	6	-
Granny smith	Kabuk (Peel)	-	-	-	-
	Etili kısım (Flesh)	8	6	7	6
Standart antibiyotikler (Standard antibiotics)	Penisilin (Penicillin)	8	28	25	28
	Gentamisin (Gentamicin)	19	27	21	26

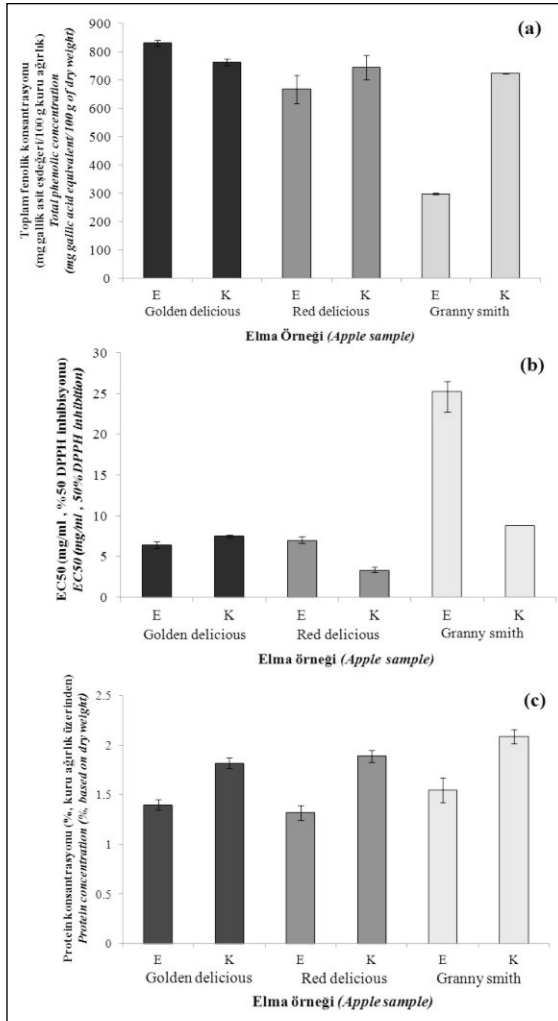
*: Dirençli (Resistant)

aynı mikroorganizmanın bir suşu özüt ile inhibe olurken, diğer suş tamamen dirençli davranmıştır. Dolayısıyla, aynı elma tipinden elde edilen özütlerin aynı mikroorganizmanın farklı suşları üzerindeki antimikrobiyel etkisinin farklı olabileceği görülmektedir.

Toplam Fenolik İçeriği

İncelenen özütler içinde en yüksek toplam fenolik içeriği (830 ± 10.8 mg GAE/100 g kuru ağırlık) Golden delicious elmanın etli kısmında bulunmuştur (Şekil 1a). Bu değeri, Golden delicious elmanın kabuk özüt fenolik içeriği (762.7 ± 12.9 mg GAE /100 g kuru ağırlık) ve Red delicious elmanın kabuk özüt fenolik içeriği (745.4 ± 43.3 mg GAE/100 g kuru ağırlık) takip etmektedir. En düşük fenolik konsantrasyonu (297 ± 3.1 mg GAE/100 g kuru ağırlık) Granny smith elmanın etli kısmında tespit edilmiştir.

Alberto vd. (2006) Granny smith ve Royal gala tip elmaların kabuklarındaki toplam fenolik miktarını da incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda Granny smith elma kabuklarının Royal gala tip elma kabuklarına göre daha yüksek miktarlarda fenolik madde içerdiğini tespit etmişlerdir (23). Granny smith elma kabuklarındaki toplam fenolik miktarı solvent sistemi tipine bağlı olarak 3.2-6.8 mg GAE/g aralığında değişmektedir. Bir başka çalışmada Drogoudi vd. (2008) 7 farklı elma tipini incelemiş, Golden delicious ve Granny smith elma kabuklarının toplam fenolik içeriğini sırasıyla yaklaşık olarak 8.0 ve 9.0 mg GAE/g kuru ağırlık olarak tespit etmişlerdir (24). Bu çalışmada ise çözücü olarak su kullanılmış ve sonuçta Golden delicious ve Granny smith elma kabuklarının toplam fenolik içeriği sırasıyla 7.6 ve 7.2 mg GAE/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Bu açıdan sonuçlar literatürle paralellik göstermektedir.



Şekil 1. a) Toplam fenolik konsantrasyonu, b) Antioksidan aktivite (EC₅₀), c) Protein konsantrasyonu. (E: Etli kısım, K: Kabuk)

Figure 1. a) Total phenolic concentration, b) Antioxidant activity (EC₅₀), c) Protein concentration. (E: Flesh, K: Peel)

Toplam Antioksidan Aktivite

Örneklerin antioksidan aktiviteleri EC₅₀ değeri ile ifade edilmekte, düşük EC₅₀ değeri yüksek antioksidan aktiviteyi ifade etmektedir. En yüksek DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi (3.32 ± 0.35 mg/ml EC₅₀ değeri) Red delicious elmaların kabuğunda bulunmuştur (Şekil 1b). Düşük fenolik içeriğiyle uyumlu olarak, en düşük antioksidan aktivite (25.22 ± 1.85 mg/ml EC₅₀ değeri) Granny smith elmaların etli kısmında tespit edilmiştir. Toplam antioksidan ve fenolik içerik analizleri, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip örnek olan Red delicious elma kabuğunun yüksek fenolik içeriğine de sahip olduğunu göstermektedir.

Benzer bir paralellik, en düşük fenol içeriğine sahip Granny smith elma etli kısımlarının en düşük antioksidan aktiviteye sahip olmasıyla tespit edilmiştir. Elma kabuklarındaki kırmızı rengin temel olarak antosiyaninlerden ileri geldiği bilinmektedir. Bu bileşikler fenolik yapıdadır ve Red delicious elma kabuklarının en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermesi, yapılarında kırmızı renge neden olan bu fenoliklerin varlığı ile uyumludur. Bu çalışmanın sonucu, yerli elma örneklerinde fenol içeriği ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyonu ve dolayısıyla fenolik bileşiklerin diyetimizdeki önemli rolünü ortaya koymaktadır.

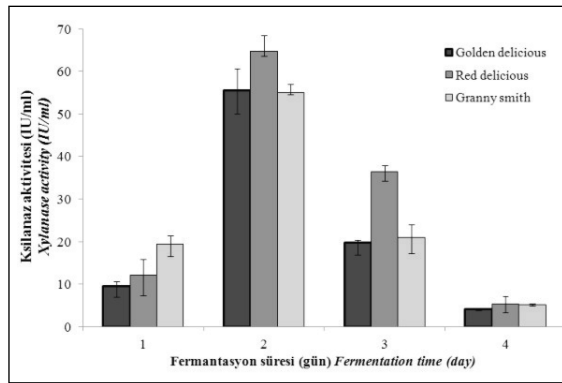
Protein İçeriği

Elmaların etli kısımları ve kabuklarından elde edilen özütlerdeki protein içeriği azot konsantrasyonuna bağlı olarak belirlenmiştir. Şekil 1c'de gösterildiği gibi, kuru ağırlık bazında en yüksek protein konsantrasyonu (2.09 ± 0.07) olarak Granny smith elmaların kabuğunda tespit edilmiş, bu değeri Red delicious elmaların kabuğunun protein içeriği (1.89 ± 0.06) izlemiştir. Her ne kadar elma beslenmemizde birincil protein kaynağı olmasa da, toplam protein alımımıza katkı sağlayabilir. Tüm örnekler bir arada incelendiğinde, genel olarak kabukların etli kısımlara oranla ortalama %36 daha fazla protein içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca literatürde elma kabuklarının yüksek oranda antioksidan aktivite ve biyoaktif maddeye sahip olduğu rapor edilmiştir (25). Bu durumda, elma tüketilirken kabuğunun soyulmasının ve kabukların atık olarak düşünülmesinin doğru olmadığı, elmaların kabuğu soyulmadan tüketilmesinin sağlık açısından daha uygun olacağı görülmektedir.

Elma Ağacı Yaprakları Kullanılarak Ksilanaz Üretimi

S. thermophilum'dan ksilanaz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere Golden delicious, Red delicious ve Granny Smith elma ağacı yaprakları kültür ortamına eklenmiştir. Denenen tüm örneklerle ksilanaz üretimi gözlemlenmiş, en yüksek ksilanaz üretimi (64.7 ± 5.3 IU/ml) Red delicious elma ağacı yapraklarıyla elde edilmiştir (Şekil 2). Bu değer, literatürde diğer karbon kaynakları kullanılarak üretilen birçok mikrobiyel ksilanaz üretim seviyesinden yüksektir. Ağaç yapraklarından enzim özütlenmesine ilişkin literatürde birçok çalışma bulunmasına karşın,

ağaç yapraklarının mikrobiyel enzim üretimi için fermantasyon ortamında kullanılmasına dair çalışmalar nadirdir. Bu konuda Elisashvili vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus dryinus*'tan ağaç yaprakları kullanılarak katı kültürde lignoselüloolitik enzim üretimi denenmiş ve 35.7-46.7 IU/ml aralığında enzim aktivitesine ulaşılmıştır (12). Elma ağacı yapraklarından ksilanaz üretilen bu çalışmada ulaşılan 64.7 ± 5.3 IU/ml enzim aktivite değeri ise gelecekte yapılacak optimizasyon ve ölçek büyütme çalışmaları için potansiyel vaat eden bir başlangıç noktasıdır.



Şekil 2. *S. thermophilum*'dan atık elma ağacı yaprakları kullanılarak gerçekleştirilen ksilanaz üretim profili
Figure 2. Xylanase production profile from *S. thermophilum* by using waste apple tree leaves

SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye, dünyanın lider elma üreticileri arasındadır ve ülkemizde Karaman, elma üretiminde ikinci sırada yer almaktadır. Çalışma kapsamında Karaman'da en çok üretilen ve tüketilen elma çeşitleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş ve bu sayede elma tüketicileri için bir referans oluşturulması hedeflenmiştir. Ayrıca, ticari elma çeşitleri için yapılan bu analizler gelecekte diğer biyoaktif maddelerin araştırılması için bir başlangıç noktası olabilir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, elmaların kabuğu soyularak tüketilmesinin yanlış bir davranış olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Granny smith elmaların farklı bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyel aktivite de, bu antimikrobiyel bileşiklerin ileri çalışmalarla karakterize edilmesi için temel teşkil edebilir. Önceki birçok çalışmada, küflerden hidrolitik enzim üretimi için şeker bazlı karbon kaynaklarının gerekli olduğu bildirilmiştir ancak bu çalışmada, elma ağacı yapraklarının şeker katkısı kullanılmadan dahi mikrobiyel ksilanaz

üretimi için uygun karbon kaynağı olduğu gösterilmiştir. Elma ağacı yapraklarının enzim üretiminde kullanılması, düşük maliyetli ve yenilenebilir bir ham maddenin kullanıldığı, çevreyle dost bir biyorafineri sürecinin geliştirilmesini sağlayabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla fermantasyon ortamı optimize edilerek enzim üretim verimi yükseltilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi tarafından BAP/41-M-12 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J*, 3, 5-19.
- Danaei G, Hoorn SV, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental factors. *Lancet*, 366, 1784-1793.
- Lu Y, Foo LY. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem*, 68, 81-85.
- Weng CJ, Yen GC. 2012. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*, 38, 76-87.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Le Merchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. 2000. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Nat Cancer Inst*, 92, 154-160.
- Wu J, Gao H, Zhao L, Liao X, Chen F, Wang Z, Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem*, 103, 88-93.
- Tamer CE, Karaman B, Aydoğan N. 2005. Aseptik elma suyu üretiminde HACCP uygulamaları. *GIDA*, 30(6), 425-430.
- Kamm B, Gruber PR, Kamm M. 2007. Biorefineries-industrial processes and products: Status quo and future directions. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

10. Sutay Kocabaş D, Ögel ZB, Bakır U. 2011. Screening of tree leaves as annual renewable green biomass for phenol oxidase production and biochemical characterization of mulberry (*Morus alba*) leaf phenol oxidases. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 701-707.
11. Collins T, Gerday C, Feller G, 2003. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 3-23.
12. Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Asatiani M, Kvesitadze G. 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme Microb Technol*, 38, 998-1004.
13. Janaszewska A, Bartosz G. 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Investig*, 62, 231-236.
14. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın J Sci Technol*, 26, 211-219.
15. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Patbol*, 45, 493-496.
16. Sutay Kocabaş D, Özben N. 2014. Co-production of xylanase and xylooligosaccharides from lignocellulosic agricultural wastes. *R Soc Chem Adv*, 4, 26129-26139.
17. Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, 426-428.
18. Bailey MJ, Biely P, Pountanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay xylanase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1117, 252-270.
19. Winter R. 1984. A consumer's dictionary of food additives. Three Rivers Press, Crown, ABD.
20. Burdock GA. 2010. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. CRC Press, ABD.
21. Kumar P, Kumaravel S, Lalitha C. 2010. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *Afr J Biochem Res*, 4, 191-195.
22. Rajasekaran M, Archana R, Raviprasadh R. 2012. GC/MS analysis and identification of phytochemicals present in the leaves of *Beloperone plumbaginifolia* (Jacq.) Nees. *Int J Bioeng Sci Technol*, 3, 134-138.
23. Alberto MR, Canavosio MAR, Manca de Nadra MC. 2006. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *Electron J Biotechnol*, 9, 205-209.
24. Drogoudi PD, Michailidis Z, Pantelidis G. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Sci Hortic*, 115, 149-153.
25. Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*, 51, 609-614.