



## Optimization of Enrichment of D-Pinitol in Carob Extract Using Nanofiltration Application Using the Response Surface Methodology

Ahmet Hacıoğlu<sup>1,a</sup>, Ursula Tania Assoumou Zoua<sup>1,b</sup>, Melis Yıldız<sup>1,c</sup>, Aslı Arslan Kulcan<sup>2,d</sup>, İbrahim Yavuz<sup>3,e</sup>, Mustafa Karhan<sup>1,f,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, Akdeniz University, 07058 Antalya, Turkey

<sup>2</sup>Department of Gastronomy and Culinary Arts, Faculty of Art and Design Akev University, 07525 Antalya, Turkey

<sup>3</sup>Department of Plant and Animal Production, School of Vocational Technical Sciences Akdeniz University, 07058 Antalya, Turkey

\*Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, 07058 Antalya, Turkey

| ARTICLE INFO                                                                                                                                                                                    | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 11/03/2020<br/>Accepted : 07/05/2020</p> <p><b>Keywords:</b><br/>Carob<br/>D-pinitol<br/>Nanofiltration<br/>Surface Methodology<br/>Enrichment</p> | <p>In this study, it was aimed to enrich D-pinitol in carob extract using nanofilters in the range of 1-5 kDa molecular weight cut-off (MWCO). Enrichment stages were extraction, clarification, adsorbent application and nanofiltration applications. The Box-Behnken Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize nanofiltration application. D-pinitol content, sugar composition, total phenolic matters (TPC), total dry matters (TDM) and total minerals were determined for the purity control of the product obtained in the final stage. The highest D-pinitol concentration in extracts was achieved in nanofiltration at the 5 kDa MWCO under the condition of 3 bar feed pressure, 25°C feed temperature and 83.3% permeate rate, in which the extract contained 10.48 g/L of D-pinitol. In the study, an optimization model based on pressure, temperature and permeate/retentate ratio variables were created for the nanofiltration process. Thus, the change in the D-pinitol concentration of the extracts depending on different conditions was mathematically modelled with a high accuracy (<math>R^2=0.91</math>). Depending on this model, the highest amount of sucrose, TPC and TDM in carob extracts was determined under the condition that the D-pinitol concentration was 8.7%.</p> |

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(9): 1846-1853, 2020

## Cevap Yüzey Metodu Kullanılarak Keçiboynuzu Ekstraktında Bulunan D-Pinitolün Nanofiltrasyon Uygulamasıyla Zenginleştirilmesinin Optimize Edilmesi

| MAKALE BİLGİSİ                                                                                                                                                                                                | Ö Z                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 11/03/2020<br/>Kabul : 07/05/2020</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b><br/>Keçiboynuzu<br/>D-pinitol<br/>Nanofiltrasyon<br/>Cevap yüzey metodu<br/>Zenginleştirme</p> | <p>Bu çalışmada keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün 1-5 kDa ayırma sınırı aralığında nanofiltreler kullanılarak zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Zenginleştirme aşamaları ekstraksiyon, durultma, adsorban uygulaması ve nanofiltrasyon uygulamalarından oluşmaktadır. Nanofiltrasyon uygulamasını optimize etmek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu (CYM) kullanılmıştır. Son aşamada elde edilen ürünün saflık kontrolü için D-pinitol içeriği, şeker kompozisyonu, toplam fenolik madde (TFM), toplam kuru madde (TKM) ve mineral madde kompozisyonları kullanılmıştır. Ekstraktlarda en yüksek D-pinitol konsantrasyonuna 5 kDa ayırma sınırındaki nanofiltrasyonda, 3 bar besleme basıncı, 25°C besleme sıcaklığı ve %83,3 permeat oranı koşullarında ulaşılmıştır. Bu koşullarda elde edilen permeat akısının D-pinitol içeriği 10,48 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca nanofiltrasyon prosesi için basınç, sıcaklık ve permeat/retentat oranı değişkenlerine bağlı bir optimizasyon modeli oluşturulmuş ve farklı koşullara bağlı olarak ekstraktların D-pinitol konsantrasyonundaki değişim yüksek doğrulukla (<math>R^2=0,91</math>) matematiksel olarak modellenmiştir. Bu modele bağlı olarak, keçiboynuzu ekstraktlarında en yüksek sakkaroz, TFM ve TKM miktarları D-pinitol konsantrasyonunun %8,7 olduğu koşulda belirlenmiştir.</p> |

<sup>a</sup> [ahacioglu.07@hotmail.com](mailto:ahacioglu.07@hotmail.com)

<sup>c</sup> [melis.yildiz@hotmail.com](mailto:melis.yildiz@hotmail.com)

<sup>e</sup> [ibrahimyavuz@akdeniz.edu.tr](mailto:ibrahimyavuz@akdeniz.edu.tr)

<sup>b</sup> <http://orcid.org/0000-0002-3189-7418>

<sup>d</sup> <http://orcid.org/0000-0002-4820-4542>

<sup>f</sup> <http://orcid.org/0000-0002-9633-7446>

<sup>b</sup> [kheurb1@gmail.com](mailto:kheurb1@gmail.com)

<sup>d</sup> [asli.kulcan@akev.edu.tr](mailto:asli.kulcan@akev.edu.tr)

<sup>f</sup> [mkarhan@akdeniz.edu.tr](mailto:mkarhan@akdeniz.edu.tr)

<sup>b</sup> <http://orcid.org/0000-0003-2528-2537>

<sup>d</sup> <http://orcid.org/0000-0002-9524-9030>

<sup>f</sup> <http://orcid.org/0000-0001-8058-3709>



## Giriş

Şeker ve mineral madde içeriği yüksek bakla yapısında bir meyveye sahip olan keçiboynuzu bitkisi (*Ceratoniasiliqua* L.), Akdeniz ikliminin hâkim olduğu yerlerde yetişmektedir. (Ekşi ve Artık 1986; Biner ve ark., 2007). Türkiye’de bu meyvenin hem yetiştiriciliği hem de ihracatı yapılmaktadır. Günümüze kadar keçiboynuzu çekirdeklerinden elde edilen ve kıvamlılaştırıcı özelliği olan keçiboynuzu gamı ve meyve etinden üretilen pekmez nedeniyle önem kazanmıştır. Son yıllarda bir şeker alkol olan D-pinitolün önemli kaynaklarından birisinin keçiboynuzu olduğu ve meyvenin etli kısmında doğal formda bulunduğu saptanmış (Baumgartner ve ark., 1986; Karhan ve ark., 2010a) ve bu durum keçiboynuzunun değerini artırmıştır. Dolayısıyla meyveden, D-pinitolün elde edilebilmesi için alternatif metotlar geliştirilmeye başlanmıştır (Streeter ve ark., 2001; Camero ve Merino 2004; Yoshida ve ark., 2006). Çok kademeli ve kimyasal girdisi olan bazı yöntemlerle yüksek saflıkta üretimi yapılabilen D-pinitol, elde edilme yönteminin pahalı olmasından dolayı yüksek fiyatlarda satılmaktadır. Bu sebeple hem daha ucuz hem de daha kolay bir yöntemle elde edilebilmesi için alternatif saflaştırma yöntemlerine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

D-pinitolün, Tip 2 şeker hastalarının diyetlerinde kullanılabilmesi ve glikoz metabolizmasını düzenlemesi ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır (Kang ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007). Bu bileşiğin gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde kullanımının giderek artacağı açıkça görülmektedir.

Keçiboynuzu baklası tohumları çıkarıldıktan sonra kuru madde bazında %52,8-65,6 oranında toplam şeker %3,60 oranında protein ve %0,2-0,4 oranında lipit içermektedir. Bunun yanında kalsiyum (110-176 mg/kg), potasyum (3501 mg/kg), magnezyum (250-416 mg/kg), sodyum (89-119 mg/kg), fosfor (130-204 mg/kg), demir (46-57 mg/kg) ile az miktarda çinko (8,1-12 mg/kg), bakır (3-12,5 mg/g), mangan (3-3,9 mg/kg), A ve B grubu vitaminleri ile önemli miktarda diyet lifi de içerdiği bildirilmiştir (Ekşi ve Artık, 1986; Karhan ve ark., 2005; Biner ve ark., 2007). Ayrıca meyve zengin şeker alkolü içeriği (%4-14) ile de önem arz etmektedir (Sanjuan Diaz, 2000). D-pinitolün ise keçiboynuzundaki şeker alkoller içerisinde en büyük fraksiyonu oluşturduğu ve meyvede ortalama miktarının %4-8 arasında olduğu belirtilmiştir (Baumgartner ve ark., 1986; Karhan ve ark., 2010a).

D-Pinitol (1D-3-O-methyl-chiro-inositol), üçüncü karbon atomunda metoksil grubu içeren yapısal olarak D-chiro inositol (DCI) türevidir bir bileşiktir (Lin ve ark., 2009). D-chiro inositol ve türevlerinin özellikle de D-pinitolün, Tip 2 şeker hastalarında insülin duyarlılığını artırarak kan şekeri seviyesini düzenlediği (Kang ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007), böbrek ve karaciğer gibi hassas organları oksidatif zarara karşı koruduğu (Shin ve ark., 2002; Sivakumar ve ark., 2010), katarakt oluşumunu önlemede etkisinin olduğu (Park ve ark., 2004) ve kadınlarda görülen polikistik over sendromunda (Yoshida ve ark., 2006) gerileme sağladığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

D-pinitolün izolasyonunda genellikle bazı ön işlemlerden sonra farklı kromatografik ayırma yöntemleri ve iyon değiştirme reçineleri kullanılmaktadır. Elde edilen ürünün maliyeti yüksek olduğu için özellikle iyon değiştirme reçineleri ve kromatografik yöntemlerle saflaştırma tekniklerine alternatif olabilecek çok kademeli, çoğunluğunu

basit fiziksel ayırma yöntemlerinin oluşturacağı metotların tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca D-pinitol ekstraksiyonu yapılacak kaynağın hem D-pinitol içeriğinin yüksek olması hem de ucuz ve kolay temin edilebilir bir kaynak olması oldukça önemlidir. Bu sebeple bu çalışmada D-pinitol içeriği bakımından zengin keçiboynuzu meyvesi materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada temel olarak keçiboynuzu ekstraktı içinde şekerlerle karışım halinde yüksek oranda bulunan D-pinitolün, ayırma sınırı 1-5 kDa (MWCO) aralığında değişen nanofiltreler kullanılarak zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemin optimizasyonu amacıyla da Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Materyal

Projede materyal olarak Antalya ili sınırları içerisinde yetişen (Gazipaşa-Alanya ve Demre-Kaş) aşılı keçiboynuzu meyveleri kullanılmıştır. Keçiboynuzu meyveleri bağ makası yardımıyla parçalanarak tohumları ayrılmış ve kırılmış meyveler (5-7 mm) plastik örnek saklama kaplarında 5°C sıcaklıktaki soğutucularda proses anına kadar muhafaza edilmiştir. Kullanılan kimyasallar Merck (Almanya) ve Sigma Aldrich (ABD) tarafından temin edilmiştir.

### Yöntem

#### Zenginleştirme Çalışmaları

Zenginleştirme amacıyla ekstraksiyon, sıcak durultma, kabafiltrasyon, adsorban uygulaması ve nanofiltrasyon basamakları kullanılmıştır. Her bir işlem basamağı için denemeler yapılmış ve optimum koşullar sağlandıktan sonra bir sonraki işlem basamağına geçilmiştir.

#### Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi, kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış 5-7 mm kalınlığında keçiboynuzu meyvesinin 1/4 meyve/su oranında, 80°C’de 2 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Turhan, 2011).

#### Sıcak Durultma

Keçiboynuzu ekstraktlarına depektinizasyon işlemi uygulanmış ve enzim uygulamasından sonra ön denemelerle belirlenen düzeyde bentonit, jelatin ve kizelzol çözeltileri kullanılarak sıcak durultma işlemi yapılmıştır (Çizelge 1) (Ekşi, 1988; Karkacier ve ark., 1996). Sıcak durultma işleminden sonra dibe çöken partiküllerin bir sonraki aşamada membran yüzeyine zarar vermemesi için keçiboynuzu ekstraktı kaba filtre kâğıdı ile süzölmüştür.

#### Adsorban uygulaması

Fenolik maddeler gibi safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla sıcak durultma sonrası elde edilen berrak ekstrakta farklı dozlarda aktif kömür (%0,2, %0,5, %1, %2) ve polivinilpolipirrolidon (PVPP) (%0,2, %0,5, %1, %2) uygulanmıştır.

#### Nanofiltrasyon

D-pinitol ekstraktının zenginleştirilmesi amacıyla 1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırında (MWCO) membranlar kullanılarak nanofiltrasyon işlemi yapılmıştır. Proses şartlarını optimize etmek ve değişken parametrelerin (basınç, sıcaklık ve permeat/retentat oranı) aralarındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu (CYM) kullanılmıştır (Çizelge 2, Çizelge 3).

### D-Pinitol ve Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi

Belirli oranda seyreltilen örneklerin D-pinitol ve şeker kompozisyonu HPLC (Shimadzu, LC 20 AD) ile harici standart metodu kullanılarak belirlenmiştir. Analizde Carbosep Corogel-87P (300 × 6,5 mm, ID) kolon ve refraktif indeks dedektör (RID) kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 85°C'ye, dedektör hücresi sıcaklığı ise 60°C'ye ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak HPLC saflıkta su kullanılmış ve akış hızı 0,6 ml/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır (Karhan ve ark., 2010b). Sakkaroz, glikoz, fruktoz (15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 ppm) ve D-pinitol (21,875, 43,75, 87,5, 175, 350, 500 ppm) bileşenlerinin farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltileri hazırlanarak oluşturulan kurveler miktar tayini için kullanılmıştır (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4).

#### Toplam fenolik madde analizi

Örneklerin, deneme desenindeki tüm işlem basamaklarındaki değişiminin birbiriyle karşılaştırılması için TFM miktarları belirlenmiştir (Spanos ve Wrolstad, 1992). Miktar tayini için gallik asitin (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 ppm) farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri kullanılarak elde edilen kurveden yararlanılmıştır (Şekil 5).

#### Toplam kuru madde analizi

Sıvı örneklerden 5 ml tartılıp etüvde (MEMMERT, Almanya) 65°C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmasıyla gerçekleştirilmiştir (Cemeroğlu, 2007).

#### Mineral madde analizi

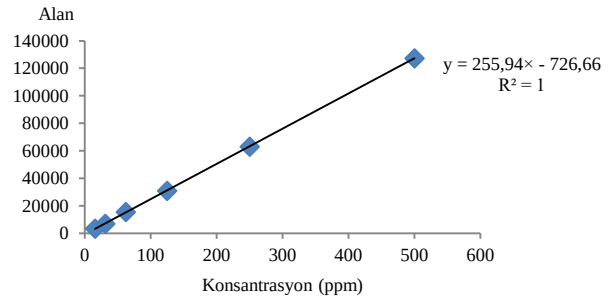
Başlangıç ve ana işlem basamaklarındaki örneklerde uygulamaların etkinliğini belirlemek amacıyla meyveden kaynaklanan mineral madde miktarı belirlenmiştir (USDA-ARS, 2004).

#### İstatistiksel analizler

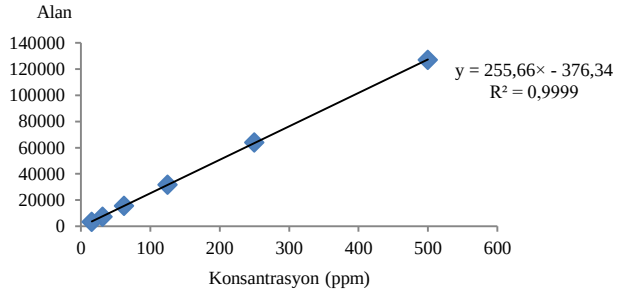
Çalışma kapsamında tüm uygulamalar 2 tekerrür her tekrürde 2 paralel (2×2) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanofiltrasyon prosesinin koşullarını optimize etmek ve değişken parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerinin etkilerini belirlemek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılmıştır (Stat-Ease Inc., Design-Expert®, Version 7.0). "Full Quadratic" cevap yüzey metodu kullanılan modeldeki değişkenler; basınç (bar), sıcaklık (°C) ve permeat/retentat oranı olarak belirlenmiştir. "Design-Expert" programı ile 1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip membranlardan elde edilen permeatların D-pinitol konsantrasyonlarına ait regresyon eşitlikleri incelenmiştir (Çizelge 4).

### Bulgular ve Tartışma

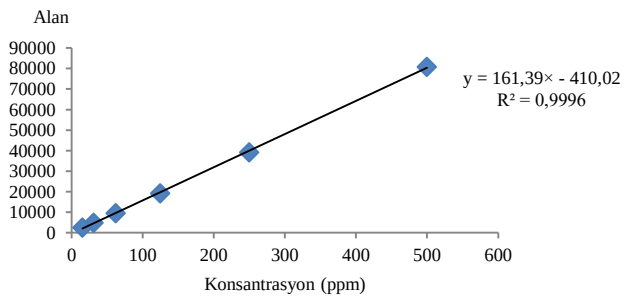
Adsorban uygulamasında, ekstraktın fenolik maddeleri giderilirken D-pinitol kaybının en az olduğu uygulamayı ve dozu belirlemek için kullanılan aktif kömür ve PVPP yardımcı maddeleri belirli hacimdeki ekstrakta (%0,2, %0,5, %1, %2 (w/v)) ilave edilmiştir. Aktif kömür dozajı arttıkça örneklerin toplam fenolik madde miktarında azalma olmasına rağmen D-pinitol miktarında da azalma olduğu için bu uygulama uygun bulunmamıştır. PVPP uygulanan örneklerde ise toplam fenolik madde ve D-pinitol miktarında meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemsiz bulunduğu için devam eden zenginleştirme basamaklarında adsorban madde uygulamasından vazgeçilmiştir.



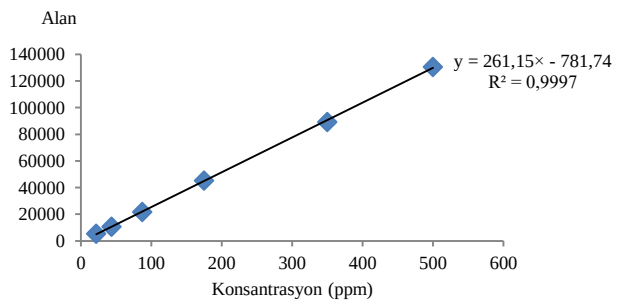
Şekil 1. Sakkaroz standart kurvesi  
Figure 1. Sucrose standard curve



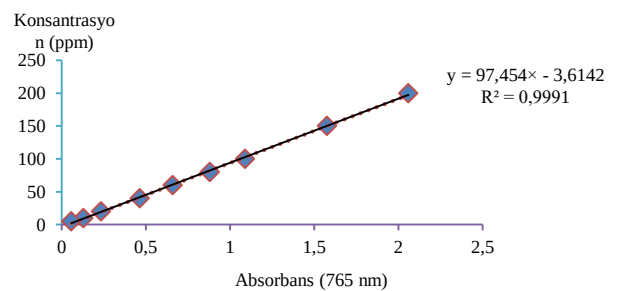
Şekil 2. Glikoz standart kurvesi  
Figure 2. Glucose standard curve



Şekil 3. Fruktoz standart kurvesi  
Figure 3. Fructose standard curve



Şekil 4. Pinitol standart kurvesi  
Figure 4. Pinitol standard curve



Şekil 5. Gallik asit standart kurvesi  
Figure 5. Gallic acid standard curve

### Nanofiltrasyon Aşamasının Optimizasyonu

*Cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda gerçekleştirilen nanofiltrasyon denemeleri ve CYM'nin modellenmesi*

Sıcaklık ve basınç faktörlerinin interaksiyonunun 1 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilen örneklerde, sıcaklık ve permeat/retentat oranı faktörlerinin interaksiyonunun ise 5 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilen örneklerde D-pinitol konsantrasyonunu istatistiksel olarak önemli seviyede ( $P < 0,05$ ) etkilediği görülmüştür (Çizelge 4). Regresyon analizi sonucu basınç (A), sıcaklık (B) ve permeat/retentat oranı (C) faktörlerine bağlı olarak 1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip membranların permeatlarındaki D-pinitol konsantrasyonu (g/L) için elde edilen ikinci dereceden polinom eşitlikleri Çizelge 5'de verilmiştir. Kullanılan 1, 2 ve 5 kDa nanofiltrelere ait modellerin  $R^2$  değerleri sırasıyla 0,89, 0,42 ve 0,91 olarak belirlenmiş ve modellerin uyum eksikliği (lack of fit) değerleri önemsiz bulunmuştur.

Cevap yüzey metodunun oluşturduğu deneme desenine göre 1, 2 ve 5 kDa nanofiltre kullanılarak gerçekleştirilen filtrasyonlarda D-pinitol konsantrasyonu için ulaşılan deneysel değerler ile regresyon eşitliğine göre program tarafından tahmin edilen değerler arasındaki ilişkiler Şekil 6'da verilmiştir. Ayrıca, üç boyutlu cevap yüzey grafiklerinde değişkenlerden biri merkez noktada sabit tutulurken yanlırlar ile diğer iki değişken arasındaki ilişki de incelenmiştir.

Ayırma sınırı 1 kDa olan nanofiltre ile yapılan işlemde permeat/retentat oranının sabit olduğu orta noktada permeatların D-pinitol konsantrasyonunun sıcaklık arttıkça arttığı; basıncın artmasıyla birlikte azaldığı görülmüştür (Şekil 7a). Sıcaklığın orta noktada sabit tutulmasıyla elde edilen grafikte permeat/retentat oranı azaldıkça D-pinitol konsantrasyonu azalmış; basınç azaldıkça 3 Bar'a kadar artış göstermiş ve ardından azalmaya başlamıştır (Şekil 7b). Basıncın orta noktada sabit tutulmasıyla D-pinitol konsantrasyonu permeat/retentat oranına bağlı olarak önemli bir değişim göstermezken, sıcaklığın azalmasıyla birlikte artış göstermiştir (Şekil 7c).

D-pinitol konsantrasyonunun, 2 kDa filtreden elde edilen örneklerde permeat/retentat oranının sabit olduğu orta noktada basınç değişiminden önemli düzeyde

etkilenmediği; fakat sıcaklığın azalmasına bağlı olarak belli bir noktaya kadar arttığı ve ardından azaldığı görülmüştür (Şekil 7d). Sıcaklığın sabit olduğu noktada D-pinitol konsantrasyonu; permeat/retentat oranıyla doğru orantılı olarak azalmış ancak basınç değişiminden etkilenmemiştir (Şekil 7e). Basıncın sabit olduğu orta noktada ise permeat/retentat oranı ve sıcaklık azaldıkça D-pinitol konsantrasyonu da azalmıştır (Şekil 7f).

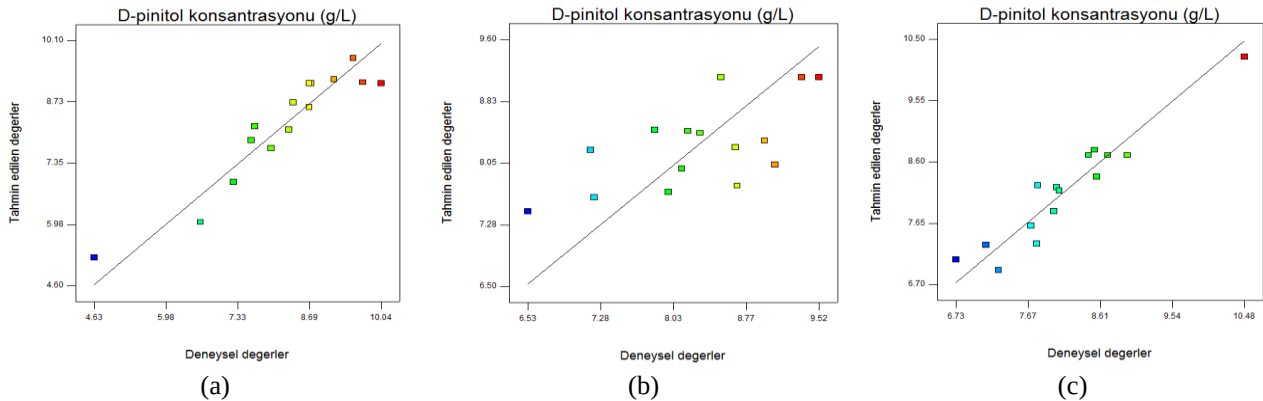
Ayırma sınırı 5 kDa olan nanofiltreden elde edilen örneklerde permeat/retentat oranının sabit tutulduğu orta noktada sıcaklık ve basıncın azalmasıyla D-pinitol konsantrasyonunun azaldığı görülmektedir (Şekil 7g). Benzer şekilde sıcaklığın sabit tutulduğu orta noktada permeat/retentat oranı ve basıncın artması ile D-pinitol konsantrasyonu azalmıştır (Şekil 7h). Basıncın sabit olduğu orta noktada ise permeat/retentat oranı ve sıcaklık azaldıkça D-pinitol konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 7i).

### Cevap Yüzey Metodu ile Belirlenen Optimum Nanofiltrasyon Koşulları

Filtrasyon sonrası elde edilen permeatların D-pinitol konsantrasyonları kullanılarak nanofiltrasyon için optimum koşullar saptanmıştır. D-pinitol konsantrasyonunun maksimum olduğu optimum koşul her bir filtre için Design-Expert programında belirlenmiştir (Çizelge 6).

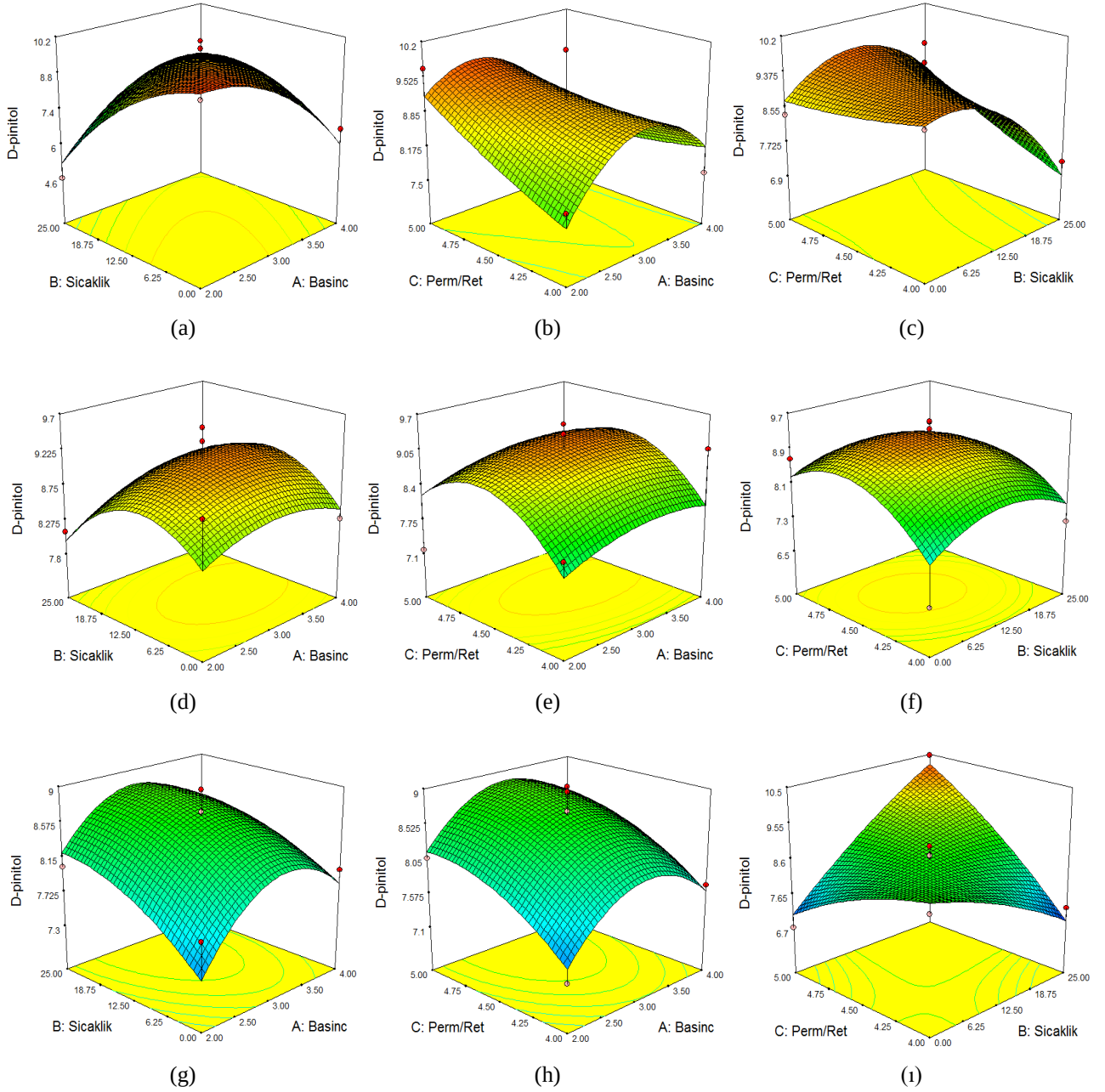
Programın belirlediği optimum koşulların istenilen hedefe ulaşma indeksi olarak bilinen d değeri (desirability) de Çizelge 6'da verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme sonucunda; modelin optimum nanofiltrasyon şartlarının 5 kDa ayırma sınırında besleme basıncının 3 bar, besleme sıcaklığının 25°C ve permeat/retentat oranının 5 olduğu koşul olarak belirlenmiştir. Bu parametreler uygulandığında elde edilecek permeat kısmının 10,23 g/L düzeyinde D-pinitol içereceği de öngörülmüştür (Çizelge 6). Bu koşullarda gerçekleştirilen nanofiltrasyon denemesinde ise elde edilen D-pinitol konsantrasyonu 10,48 g/L olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, eşitliklerden elde edilen değerler ile deneysel değerler arasında en yüksek korelasyona ( $R^2=0,91$ ) membran ayırma sınırı 5 kDa olan nanofiltre kullanıldığında ulaşılmış ve model tahminlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 6. CYM deneme desenine göre gerçekleştirilen nanofiltrasyonlar sonucu 1 kDa (a), 2 kDa (b) ve 5 kDa (c) ayırma sınırındaki filtreden deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen D-pinitol konsantrasyonu değerleri

Figure 6. The experimentally obtained and estimated D-pinitol concentration values from the filter at the separation limit of 1 kDa (a), 2 kDa (b) and 5 kDa (c) as a result of nanofiltrations performed according to the RSM



Şekil 7. Nanofiltrasyonda 1 kDa (a, b, c), 2 kDa (d, e, f) ve 5 kDa (g, h, i) ayırma sınırındaki filtre ile elde edilen örneklerin D-pinitol içeriğine bağlı cevap yüzey grafikleri

Figure 7. Response surface graphs based on D-pinitol content of the samples obtained with 1 kDa (a, b, c), 2 kDa (d, e, f) and 5 kDa (g, h, i) filter in nanofiltration

Çizelge 1. Keçiboynuzu ekstraktının durultma koşulları

Table 1. Clarification conditions of carob extract

|                                   |                                                                            |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Depektinizasyon (50°C, 45 dakika) | 50 µL/L-Enzim karışımı (Pectinex 3XL)                                      |
| Sıcak Durultma (50°C, 3 saat)     | 4 ml/L-Bentonit (%0,5)<br>10 ml/L-Jelatin (%0,5)<br>15 ml/L-Kizelzol (%15) |

Çizelge 2. Cevap Yüzey Metodu için nanofiltrasyon parametreleri

Table 2. Nanofiltration parameters for the Response Surface Method

| Değişken               | Minimum | Maksimum |
|------------------------|---------|----------|
| Basınç (bar)           | 2       | 4        |
| Sıcaklık (°C)          | 0       | 25       |
| Permeat/Retentat Oranı | 4       | 5        |



Çizelge 3. Farklı ayırma sınırına sahip filtrelerde gerçekleştirilen denemelerden elde edilen örneklerin D-pinitol içerikleri  
Table 3. D-pinitol contents of the samples obtained from filters with different separation limits

| Sıra | Basınç (bar) | Sıcaklık (°C) | Permeat/Retentat | D-Pinitol (g/L) |       |       |
|------|--------------|---------------|------------------|-----------------|-------|-------|
|      |              |               |                  | 1 kDa           | 2 kDa | 5 kDa |
| 1    | 3            | 0             | 5                | 8,38            | 8,66  | 6,73  |
| 2    | 3            | 12,5          | 4,5              | 8,72            | 8,51  | 8,70  |
| 3    | 3            | 25            | 4                | 7,25            | 7,21  | 7,28  |
| 4    | 4            | 25            | 4,5              | 8,30            | 7,83  | 7,79  |
| 5    | 3            | 12,5          | 4,5              | 8,68            | 9,52  | 8,45  |
| 6    | 4            | 12,5          | 4                | 7,65            | 9,07  | 7,70  |
| 7    | 4            | 12,5          | 5                | 7,59            | 8,17  | 8,56  |
| 8    | 2            | 12,5          | 5                | 9,69            | 7,17  | 8,07  |
| 9    | 3            | 12,5          | 4,5              | 10,04           | 9,34  | 8,96  |
| 10   | 2            | 25            | 4,5              | 4,63            | 8,11  | 8,04  |
| 11   | 3            | 25            | 5                | 8,68            | 8,68  | 10,48 |
| 12   | 3            | 0             | 4                | 9,15            | 6,53  | 8,53  |
| 13   | 2            | 12,5          | 4                | 7,96            | 7,97  | 7,12  |
| 14   | 4            | 0             | 4,5              | 6,63            | 8,30  | 8,00  |
| 15   | 2            | 0             | 4,5              | 9,51            | 8,96  | 7,78  |

Çizelge 4. 1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırında filtreden numunelerin D-pinitol konsantrasyon değerlerinin varyans analizi ve regresyon katsayıları

Table 4. Variance analysis and regression coefficients of D-pinitol concentration values of samples from the filter at the separation limit of 1, 2 and 5 kDa

| Terim          | Katsayılar |       |       | P       |       |         |
|----------------|------------|-------|-------|---------|-------|---------|
|                | 1 kDa      | 2 kDa | 5 kDa | 1 kDa   | 2 kDa | 5 kDa   |
| Sabit          | 9,15       | 9,12  | 8,70  |         |       | 0,0402* |
| A              | -0,20      | 0,15  | 0,13  |         |       |         |
| B              | -0,60      | -0,08 | 0,32  |         |       |         |
| C              | 0,29       | 0,24  | 0,40  |         |       |         |
| AB             | 1,64       | 0,10  | -0,12 | 0,0079* |       |         |
| AC             | -0,45      | -0,03 | -0,02 |         |       |         |
| BC             | 0,55       | -0,16 | 1,25  |         |       | 0,0028* |
| A <sup>2</sup> | -1,01      | -0,25 | -0,60 |         |       |         |
| B <sup>2</sup> | -0,87      | -0,57 | -0,20 |         |       |         |
| C <sup>2</sup> | 0,09       | -0,78 | -0,24 |         |       |         |

Çizelge 5. D-pinitol konsantrasyonu (g/L) için elde edilen ikinci dereceden polinom eşitlikleri

Table 5. Quadratic equations obtained for D-pinitol concentration (g/L)

| Filtre Ayırma Sınırı | D-pinitol (g/L)                                                                         |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 kDa                | $9,15 - 0,20A - 0,60B + 0,29C + 1,64AB - 0,45AC + 0,55BC - 1,01A^2 - 0,87B^2 + 0,09C^2$ |
| 2 kDa                | $9,12 + 0,15A - 0,08B + 0,24C + 0,10AB - 0,03AC - 0,16BC - 0,25A^2 - 0,57B^2 - 0,78C^2$ |
| 5 kDa                | $8,70 + 0,13A + 0,32B + 0,40C - 0,12AB - 0,02AC + 1,25BC - 0,60A^2 - 0,20B^2 - 0,24C^2$ |

Streeter ve ark. (2001) tarafından yürütülen bir çalışmada soya fasulyesi yapraklarının etanolik ekstraktları solvent muamelesiyle yağdan arındırıldıktan sonra kullanılan iyon değiştirme reçineleri ve devamında uygulanan aktif kömür filtrasyon işlemi sonucunda ağırlıkça %85,5 oranında saf kristal formda D-pinitol eldesinin mümkün olduğu bildirilmiştir. Camero ve Merino (2004) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise keçiyoynuzu ekstraktından D-pinitol ekstraksiyonu için öncelikle inversiyon işlemi uygulanarak sakkarozun, glikoz ve fruktoza dönüşümü sağlanmış, daha sonra ekstraktın kromatografik seperasyonu ile de D-pinitolün %90'a varan oranda sulu çözeltisi elde edilmiştir. Yoshida ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise genetiği değiştirilen *Bacillus subtilis* bakterisinden DCI üretimi amaçlanmıştır. Buna göre araştırmacıların elde ettiği bulgulara göre çalışmada materyal olarak kullanılan myo-inositol girdisinin sadece %6'lık kısmı ilgili tür tarafından DCI'ya dönüştürülebilmiştir. Öziyici ve ark. (2015)

tarafından yapılan bir diğer çalışmada da keçiyoynuzundan D-pinitolün elde edilebilmesi amacıyla fermentasyon, filtrasyon ve solvent ekstraksiyonu yöntemlerinin kullanıldığı ve sonuçta kuru madde üzerinden %9,38'den %37,53'e ulaşıldığı rapor edilmiştir.

#### Farklı Nanofiltrasyon Koşullarında Elde Edilen Permeatların Sakkaroz, Glikoz ve Fruktoz İçerikleri

Farklı nanofiltrasyon koşullarında elde edilen permeatların sakkaroz, glikoz ve fruktoz içerikleri Çizelge 7'de verilmiştir. Nanofiltrasyon denemelerinden elde edilen permeatların sakkaroz içerikleri üzerine basınç, sıcaklık ve permeat/retentat oranı faktörlerinin etkileri incelendiğinde basıncın etkisi 1 ve 2 kDa ayırma sınırında istatistiksel olarak önemli bulunurken ( $P < 0,05$ ), sıcaklığın etkisi ise yalnızca filtrasyon ayırma sınırı 5 kDa olduğunda önemli bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Ayrıca, permeat/retentat oranı faktörünün etkisi 2 kDa ve 5 kDa ayırma sınırına sahip filtreler için önemli olmuştur ( $P < 0,05$ ). Denemelerde

kullanılan ana faktörlerin ikili interaksyonları incelendiğinde 2 kDa ve 5 kDa ayırma sınırında filtrelerde sıcaklık  $\times$  permeat/retentat oranı ile basınç  $\times$  basınç ikili interaksyonlarının etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Nanofiltrasyonda 2 kDa ayırma sınırına sahip membranların kullanıldığı denemelerde permeat/retentat oranı faktörü ve basınç  $\times$  basınç ikili interaksyonu permeatların glikoz miktarı üzerine önemli seviyede etki göstermiştir ( $P<0,05$ ). Bunun dışında, fruktoz konsantrasyonu üzerine basınç, sıcaklık ve permeat/retentat faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Türkiye’de yabancı ve kültüre alınmış keçiyoynuzu örneklerinin şeker profillerinin araştırıldığı bir çalışmada, kültüre alınmış keçiyoynuzunun sakkaroz içeriği 298,0-635,0 g/kg, glikoz içeriği 14,5-70,0 g/kg ve fruktoz içeriği 67,1-179,0 g/kg aralığında bulunmuştur (Biner ve ark., 2007). Turhan (2014) tarafından; yabancı ve kültüre alınmış keçiyoynuzunun D-pinitol ve şeker profili arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, kültüre alınmış keçiyoynuzunun sakkaroz, glikoz ve fruktoz içeriklerinin sırasıyla 348,78-518,46 g/kg, 35,00-80,57 g/kg ve 52,01-124,59 g/kg aralığında değiştiği bildirilmiştir.

#### **Farklı Nanofiltrasyon Koşullarında Elde Edilen Permeatların TFM İçerikleri**

Permeatlarda TFM miktarının membran ayırma sınırı 1, 2 ve 5 kDa olan filtrelerde sırasıyla 393,87-567,10 mg/L, 429,69-647,99 mg/L ve 417,99-820,24 mg/L değerleri arasında değiştiği görülmüştür. Ana varyasyon kaynakları olan basınç, sıcaklık ve permeat/retentat oranının etkileri incelendiğinde 1 kDa ayırma sınırında filtreden elde edilen permeat örneklerinin TFM miktarı üzerine basınç faktörünün etkisi önemli bulunurken, 2 ve 5 kDa ayırma sınırında filtrelerden elde edilen örneklerin TFM miktarı üzerine sıcaklık faktörünün etkisi önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Basınç, sıcaklık ve permeat/retentat oranı faktörlerinin ikili interaksyonları incelendiğinde 1 kDa ayırma sınırına sahip filtreyle yapılan denemelerde sıcaklık  $\times$  permeat/retentat oranı, basınç  $\times$  basınç, sıcaklık  $\times$  sıcaklık; 2 kDa ayırma sınırına sahip filtrenin kullanıldığı denemelerde basınç  $\times$  sıcaklık, basınç  $\times$  permeat/retentat oranı, sıcaklık  $\times$  sıcaklık ve 5 kDa ayırma sınırına sahip filtrenin kullanıldığı denemelerde ise sadece sıcaklık  $\times$

sıcaklık ikili interaksyonları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

El Hajaji ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 3 farklı türde keçiyoynuzu kabuğu, etil asetat ve metanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve aşılı keçiyoynuzu türünün toplam fenolik madde içeriğinin sırasıyla 580 mg/L (GAE) ve 620 mg/L (GAE) düzeylerinde olduğu bildirilmiştir. Roseiro ve ark. (2013) tarafından yapılan; geleneksel, ultrases destekli ve süper kritik yöntemler kullanılarak iki farklı çözücüde keçiyoynuzunun ekstrakte edildiği bir çalışmada ise geleneksel ekstraksiyonda %100 su kullanılması ile birlikte 5,8 mg GAE/g kuru madde düzeyinde TFM içeriğine ulaşıldığı rapor edilmiştir.

#### **Farklı Nanofiltrasyon Koşullarında Elde Edilen Permeatların TKM İçerikleri**

1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırındaki filtreden elde edilen örneklerin TKM içerikleri sırasıyla %8,04-10,72, %8,60-10,40 ve %8,57-12,05 aralığında değişmektedir. Varyans analizi sonuçlarına göre sadece, 2 kDa ayırma sınırında filtre kullanılarak elde edilen örneklerin TKM miktarı üzerine basınç  $\times$  permeat/retentat oranı ikili interaksyonunun önemli düzeyde etkisi olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ).

#### **Farklı Nanofiltrasyon Koşullarında Elde Edilen Permeatların Mineral Madde Miktarı**

Mineral madde miktarının, membran ayırma sınırı 1, 2 ve 5 kDa olan filtrelerden elde edilen örneklerde sırasıyla %0,22-0,94, %0,23-0,63, %0,25-0,80 değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre sadece 1 kDa filtreden elde edilen örneklerin mineral madde miktarı üzerine sıcaklık faktörünün etkisi önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

Özcan ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada keçiyoynuzunun meyvesi, öğütülmüş hali ve şurubunun bazı bileşim özellikleri ile mineral içeriği araştırılmış ve mineral içeriklerinin sırasıyla %3,33, %2,92 ve %2,16 olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Öziyici ve ark. (2014) tarafından; aşılı ve yabancı keçiyoynuzu meyvesi ile tohumlarının mineral bileşimi üzerine yapılan bir çalışmada ise, aşılı keçiyoynuzu meyvesinin mineral içeriğinin %2,04-4,37 aralığında tespit edildiği rapor edilmiştir.

Çizelge 6. Keçiyoynuzu ekstraktı için belirlenen optimum nanofiltrasyon koşullarında D-pinitol miktarı için tahmin edilen değerler

Table 6. Estimated values for D-pinitol amount under optimum nanofiltration conditions determined for carob extract

| Filtre Ayırma Sınırı | D Değeri (Hedefe ulaşma indeksi) | Koşullar     |               |                  | Tahmin Edilen D-Pinitol Miktarı (g/L) |
|----------------------|----------------------------------|--------------|---------------|------------------|---------------------------------------|
|                      |                                  | Basınç (bar) | Sıcaklık (°C) | Permeat/Retentat |                                       |
| 1 kDa                | 0,99                             | 2            | 0             | 5                | 9,98                                  |
| 2 kDa                | 0,88                             | 3            | 12            | 4,6              | 9,16                                  |
| 5 kDa                | 0,93                             | 3            | 25            | 5                | 10,23                                 |

Çizelge 7. Permeatların sakkaroz, glikoz ve fruktoz içerikleri

Table 7. Sucrose, glucose and fructose content of the permeates

| Filtre Ayırma Sınırı | Permeat Konsantrasyonu (g/L) |             |             |
|----------------------|------------------------------|-------------|-------------|
|                      | Sakkaroz                     | Glikoz      | Fruktoz     |
| 1 kDa                | 16,53-24,8                   | 19,92-28,9  | 14,52-23,74 |
| 2 kDa                | 16,10-21,75                  | 20,61-26,02 | 13,99-30,21 |
| 5 kDa                | 17,88-27,16                  | 19,28-26,98 | 15,12-20,30 |

## Sonuç

Ekstraktlarda en yüksek D-pinitol konsantrasyonuna 5 kDa ayırma sınırına sahip nanofiltrede; 3 bar besleme basıncında, 25°C besleme sıcaklığında ve permeat/retentat oranının 5 olduğu koşulda ulaşılmıştır. Bu koşullarda elde edilen ekstraktın 10,48 g/L D-pinitol içerdiği belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktın D-pinitol konsantrasyonu ise %8,7 olarak hesaplanmıştır. Nanofiltrasyon uygulaması keçiboynuzu ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı üzerine 1, 2 ve 5 kDa ayırma sınırlarında etkili olurken toplam mineral madde miktarı üzerine 1 kDa ayırma sınırında etkili olmuştur. Ayrıca şeker kompozisyonundaki değişim farklı sıcaklık ve basınç uygulamalarında farklılık göstermiştir.

## Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (FBA-2015-808) desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Baumgartner S, Genner-Ritzmann R, Haas J, Amado R, Neukom H. 1986. Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5): 827-829.
- Biner B, Gubbuk H, Karhan M, Aksu M, Pekmezci M. 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100 2007 1453-1455.
- Camero BM, Merino CS. 2004. Method of Obtaining Pinitol From Carob Extracts. United States Patent 6699511. March 2.
- Cemeroğlu B. 2007. Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler. Gıda Analizleri' (Food Analysis). ed. by B. Cemeroğlu. Ankara. GTD Yayınları, (34): 45-128. ISBN: 9786056341939
- Ekşi A. 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Dergisi (GTD), Yayın No: 9 San Matbaası, Ankara, 127 Ss.
- Ekşi A, Artık N. 1986. Harnup (keçiboynuzu) meyvesi ve pekmezinin kimyasal bileşimi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, 36(1): 77-82.
- El Hajaji H, Lachkar N, Alaoui K, Cherrah Y, Farah A, Ennabili A, El Bali B, Lachkar M. 2011. Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal Chemistry*, 4: 321-324.
- Kang MJ, Kim JI, Yoon SY, Kim JC, Cha JJ. 2006. Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*, 9(2): 182-6.
- Karhan M, Gübbük H, Turhan İ, Tetik N, Öziyici HR, Akgül H, Uçgun K. 2010a. Türkiye'de yetişen keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) tiplerinin biyoaktif bir molekül olan D-pinitol içeriği üzerine çevre unsurları ve bileşim unsurlarının etkisi. TÜBİTAK Projesi Proje, (107O650).
- Karhan M, Turhan İ, Tetik N, Aksu M. 2005. Nutritive value of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pekmez; a traditional product of Turkey. Conference: Innovations on Traditional Foods. Valencia. Spain.
- Karhan M, Tetik N, Turhan İ, Öziyici HR. 2010b. D-pinitol content of carob beans (*Ceratonia siliqua* L.). Conference: 28th International Horticultural Congress. 22-27 August. Lisboa. Portugal.
- Karkacier M, Artık N, Certel M. 1996. The conditions for carob (*Ceratonia siliqua* L.) extraction and the clarification of the extract. *Fruit Processing (Germany)*.
- Kim MJ, Yoo KH, Kim JH, Seo YT, Ha BW, Kho JH, Shin YG, Chung CH. 2007. Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77S 2007, S247-S251.
- Lin X, Ma L, Gopalan C, Ostlund RE. 2009. D- chiro-Inositol is absorbed but not synthesised in rodents. *The British Journal of Nutrition*, 102(10): 1426-34.
- Özcan MM, Arslan D, Gökçalık H. 2007. Some compositional properties and mineral contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 58(8): 652-658.
- Öziyici HR, Tetik N, Turhan İ, Yatmaz E, Uçgun K, Akgül H, Gubbuk H, Karhan M. 2014. Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits. *Scientia Horticulturae*, 167: 149-152.
- Öziyici HR, Turhan İ, Tetik N, Kulcan AA, Akkoyun T, Yatmaz E, Germeç M, Karhan M. 2015. Concentration of d-pinitol in carob extract by using multi-stage enrichment processes. *GIDA* 40 (3): 125-131.
- Park J, Lee Y, Kim J, Shin Y, Kim J. 2004. The effect of pinitol on cataractogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(13): 1705-1705.
- Roseiro LB, Duarte LC, Oliveira DL, Roque R, Bernardo-Gil MG, Martins AI, Sepúlveda C, Almeida J, Meireles M, Gírio, FM, Rauter AP. 2013. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47: 132-138.
- Sanjuan Diaz C. 2000. A syrup consisting of natural carob sugars and a process for its production, Compania General Del Algarrobo De Espana. S.A. (Ciudad de Sevillano. 20, Poligono Industrial Fuente del Jarro, Paterna (Valencia). E-46980, ES.
- Shin YC, Jeon YJ, Kim JJ, Choi CM. 2002. Method of recovering pinitol or chiro-inositol in high yield from soy fractions. United States Patent, 20030186401.
- Sivakumar S, Palsamy P, Subramanian SP. 2010. Impact of D-pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 237-45.
- Spanos AG, Wrolstad RE. 1992. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1478-1487.
- Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ. 2001. Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 24(4): 429-38.
- Turhan İ. 2011. Optimization of extraction of d-pinitol and phenolics from cultivated and wild types of carob pods using response surface methodology. *International Journal of Food Engineering*, 7(6): 1556-3758.
- Turhan İ. 2014. Relationship between sugar profile and d-pinitol content of pods of wild and cultivated types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *International Journal of Food Properties*, 17(2): 363-370.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2004. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 17. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.
- Yoshida K, Yamaguchi M, Morinaga T, Ikeuchi M, Kinehara M, Ashida H. 2006. Genetic modification of *Bacillus subtilis* for production of d-chiro-Inositol, an investigational drug candidate for treatment of type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome. *Appl Environ Microbiol*, 72(2): 1310-5