

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PEKMEZ MODEL ÜRETİM DESENİNDE SO₂ UYGULAMASININ
HİDROKSİMETİLFURFURAL (5-HMF) DÜZEYİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

FBY-08-599

Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Mahmut DOĞAN
Fen Bilimleri Enstitüsü/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Mustafa MORTAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

OCAK 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Gıdalarda Esmerleşme Reaksiyonları	9
2.1.1. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları.....	9
2.1.2. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları	9
2.1.2.1. Maillard Reaksiyonları	10
2.1.2.2. Karamelizasyon	12
2.1.2.3. Askorbik Asit Oksidasyonu	12
2.2. Gıdalarda 5-HMF Oluşumu	14
2.3. 5-HMF’ nin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	14
2.4. Bebek Mamalarında 5-HMF Tespiti Üzerine Çalışmalar	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1 Optimizasyon İçin Kullanılan Standart Maddeler.....	18
3.1.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.1.3. Bebek Mamaları	18
3.2. Kullanılan Cihazlar	18
3.3. Yöntem.....	18
3.3.1. Model Sistemde HMF Analiz Yönteminin Optimizasyonu	18
3.3.1.1. Bağlı HMF Analizi	18
3.3.1.2. Model Sistem Bileşenlerinde HMF Analizi	19
3.3.1.3. Protein-Şeker Kombinasyonlarında HMF Analizi.....	19
3.3.2. Bebek Maması Kimyasal Analizleri.....	19
3.3.2.1 pH Değeri.....	19
3.3.2.2. Kuru Madde Tayini.....	19
3.3.2.3. Protein Tayini	20
3.3.2.4. Şeker Analizi.....	20

3.3.2.5. HMF Analizi	21
3.3.2.5.1. Geleneksel HMF Analizi	21
3.3.2.5.2. Modifiye HMF Analizi	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	25
4.1. Model Sistemde HMF Yöntem Optimizasyonu Analiz Sonuçları	25
4.1.1. Bağlı HMF Analiz Sonuçları	25
4.1.2. Model Sistem Bileşenlerinde HMF Analiz Sonuçları	27
4.1.3. Protein-Şeker Kombinasyonlarında HMF Analiz Sonuçları	27
4.2. Bebek Maması Kimyasal Analiz Sonuçları	29
4.2.1. pH Tayini Sonuçları	29
4.2.2. Kuru Madde Tayini Sonuçları	30
4.2.3. Protein Tayini Sonuçları	31
4.2.4. Şeker Analizi Sonuçları	33
4.2.5. HMF Analizi Sonuçları	34
4.2.5.1. Geleneksel HMF Analizi Sonuçları	34
4.2.5.2. Modifiye HMF Analizi Sonuçları	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
6. KAYNAKLAR	41

ÖZET

Geleneksel gıdalarımızdan biri olan pekmezde kaynatma işlemi sırasında şeker ve protein ısı uygulaması nedeniyle reaksiyon verirler. Bu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu sonucu ortaya çıkan 5-HMF maddesi insan sağlığını olumsuz etkileyen bir maddedir. Bu madde sadece kaynatma işlemi sırasında değil depolama sürecinde de artmaktadır. Yasa gereği bu maddenin olması gereken maksimum düzey (70 mg/kg) belirlenmiştir. Bütün pekmez üreticilerin temel beklentisi ürünlerinin bu düzeyi aşmamasıdır. Bu nedenle 5-HMF düzeyini azaltıcı yönde bazı teknolojik uygulamaların yapılması gerekmektedir. 5-HMF düzeyini düşürebilmek için bazı uygulamaların daha önceden yapıldığı ve bazı mikroorganizmaların HMF parçaladığı tespit edilmiştir. Ancak pratikte endüstriyel olarak bu uygulamanın zorluğu bizi inört (SO_2) gaz uygulamaya yönelik çalışmamıza neden olmuştur.

Araştırma konumuzun amacı doğrultusunda üzüm şirasının bir kısmına belirli (150 ppm) düzeyde SO_2 uygulaması yapılmıştır. Ardından şiradan değişik brikslerde pekmez üretimi yapılmıştır. Aynı briks değerlerine sahip SO_2 uygulamasının yapılan ve yapılmayan farklı pekmezlerde HPLC cihazı kullanılarak 5-HMF düzeyi saptanmıştır. Yapılan analizler sonucunda SO_2 uygulamasının pekmezdeki 5-HMF düzeyini düşürmediği tespit edilmiştir. Bunun üzerine çalışmaya yeni bir boyut kazandırılmıştır. Glikoza kıyasla fruktozdan 5-HMF oluşumu daha yüksek olduğundan üzüm şirası içerisindeki glikoz-fruktoz oranı enzim vasıtasıyla değiştirildiğinde, mevcut şiradan pekmez üretildiğinde 5-HMF miktarının düşürülebileceği öngörülmüştür. Ancak yapılan çalışmalar söz konusu öngörüğü desteklememiştir.

Tüm bu çalışmaların devamında araştırmanın temel konusu olan 5-HMF üzerinden devam edilmiş ve bu safhada toz gıdalarda 5-HMF tespit metodu incelenmiştir. Model olarak seçilen bebek maması gibi ısıl işlem görmüş toz gıdalarda mevcut HMF miktarının tespitinde kullanılan yöntemin optimizasyonu bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda toz gıdaların temel bileşenlerinin (protein, şeker, kıvam vericiler) bulunduğu model sistemler oluşturularak ve bebek mamaları kullanılarak yöntemin zayıf yönleri tespit edilmiştir.

ABSTRACT

Because of the heat treatment, a reaction occurred between sugar and protein in pekmez which is the one of traditional foods. 5-HMF has hazardous effects for the human health formed in consequences of the non enzymatic reaction. The level of the 5-HMF is increase not only during heat treatment but also self life. Maximum 5-HMF level in pekmez decided 70 mg/kg according to the regulations. All of pekmez producers hope that level of 5-HMF of their products is not above the maximum limit. Some technological applications for reducing HMF level have to made. It is established that some applications are made for reducing its amount and some microorganisms are destroyed the 5-HMF. Difficulties of this method for practical industrial application give rise to our study's focused on inert gas () treatment.

According to aim of our study, SO₂ (150 ppm) is added in part of grape wort. The next step, grape molasses have some different brix are produced from control and another grape wort SO₂ in. 5-HMF analysis are made on control and other samples which has same brixes using HPLC. As a results of the analysis, SO₂ treatment on grape wort don't decrease amount of 5-HMF in grape molasses. Therefore, new a dimension on the study is added. Because of fructose is better source than glucose for occurring 5- HMF, it is predicted that amount of the fructose in the grape wort is reduced by using enzyme which converting fructose to glucose. But making this treatment is not supported to the predict.

At the end of these analysis, it is decided that 5-HMF method for powder food is examined. The aim of study is that the method for determined HMF amount in powder food like infant food is optimized. Therefore, some models have different food content as protein, sugar, gums are occurred for the purposed determining weakness of method.

1.GİRİŞ

Gıdalara uygulanan ısı işlemler, gıdanın tüketilebilir hale getirilmesinde ve muhafaza edilmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Söz konusu gıda işleme yöntemi yeterli ve uygun düzeyde uygulandığında gıdaya istenilen organoleptik ve besinsel özellikleri kazandırırken, gereğinden fazla miktarda uygulanan ısı işlem sonucunda besinsel kayıp olmasının yanı sıra gıdanın kimyasal yapısının hasar görmesine neden olmaktadır (Rada-Mendoza ve ark., 2002).

Protein, karbonhidrat, yağ, su, vitaminler ve mineral maddeler gıdaların kimyasal bileşenlerini oluşturmaktadır. Gerek ısı uygulamalar sırasında protein ve karbonhidratlar arasında ve gerekse de bileşenlerin kendi içlerinde birtakım reaksiyonlar gerçekleşmektedir (Ferrer ve ark., 2002). Bu reaksiyonlar karamelizasyon, askorbik asit degradasyonu, maillard reaksiyonu ve pigment parçalanması gibi reaksiyonlardır (Ekici, 2005).

Esmerleşme reaksiyonu (maillard reaksiyonu) indirgen şekerlerce zengin gıdaların uygun olmayan sıcaklıklarda işlem görmesi veya depolanması sırasında gözlemlenen temel etkileşimlerden birisidir (Albala-Hurtado ve ark., 1997).

Karboniller ve aminler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu; gıdanın stabilitesi, tat gelişimi, besinsel özelliklerinin yanı sıra insan sağlığı üzerinde de büyük bir rol oynamaktadır (Waller ve Feather, 1983; Fujimaki ve ark., 1986; Finot ve ark., 1990; Labuza ve ark., 1994). Gıdalarda renk oluşumu (Danehy, 1986; Quintas ve ark., 2007) ve istenen tat-aroma gelişimi (O'Brein ve Morrissey, 1989) söz konusu reaksiyonun olumlu sonuçları olarak sırlanabilir. İstenmeyen tat ve aroma gelişimi (Hodge, 1967; Hodge, 1972; Eichner ve Ciner-Doruk, 1981) besin değerinde kayıpların olması (O'Brein ve Morrissey, 1989) ve toksik bileşenlerin oluşumu (Kolpe ve ark., 2002) ise Maillard reaksiyonunun olumsuz sonuçlarıdır.

Maillard reaksiyonun zincirleme ve karmaşık olarak ilerlemesi sonucunda furfuraller ortaya çıkmaktadır. Maillard reaksiyonunun ileri aşamalarındaki pigmentlerin (melanoidinler) oluşumundaki ara ürünler furfurallerdir (Morales ve ark., 1992). Bu furfural grupların içinde en yaygın olarak bilinen 4 değişik bileşik bulunmaktadır; hidroksimetilfurfural (HMF), furfural (F), furil-metilseton (FMC) ve metilfurfural (MF). Bu bileşikler Maillard reaksiyonunun derecesinin belirlenmesi hususunda kalite indikatörü olarak kullanılabilir

(Guerra-Hernandez ve ark., 1992; Lo Coco ve ark., 1992; Albala-Hurtado ve ark., 1998). Söz konusu kimyasal bileşikler sayesinde ısıtılma işlemi uygulanmış gıdaların kalitesinin belirlenmesi sağlanabilmektedir. Böylece işleme aşamalarının sıcaklık değerleri kontrol edilmek suretiyle üretim koşullarının optimizasyonu sağlanabilmektedir (Rada-Mendoza ve ark., 2002).

HMF sadece Maillard reaksiyonu sonucunda değil aynı zamanda karamelizasyon ve askorbik asit degradasyonu sonucunda da açığa çıkmaktadır.

Karamelizasyon reaksiyonunun ilk basamağında sükröz parçalanması, ardından da glikoz ve fruktoz üretimi meydana gelmektedir (Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve ark., 1996; Lowary ve Richards, 1988; Mauch, 1971; Richards, 1986). Bu ürünlerin ileri parçalanmaları, özellikle ısıya dayanıklı HMF ve diğer bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır (Antal ve ark., 1990; Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve ark., 1996; Kroh, 1994; Lowary ve Richards, 1988; Mauch, 1971). Ayrıca heksozun doğrudan ısıtılması sonucunda da HMF oluşumu tespit edilmiştir (Lee, 1983).

Dehidro askorbik asit gibi amin varlığında furfural ve kahverengi pigment oluşumu yönündeki reaksiyonda reaktif olarak rol oynamaktadır. Çalışmalar L-askorbik asit parçalanmasının hidroksimetilfurfural oluşumuyla sonuçlandığını ifade etmektedir (Roig ve ark. 1999).

Isı etkisi ile gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda oluşan HMF, gıdada ısıtılma işlemlerin saptanmasında bir gösterge olarak kullanılabilir ancak HMF' nin insan sağlığı üzerine olan etkileri göz ardı edilmemelidir.

HMF ve 5-klorometilfurfural, 5-sülfooksimetilfurfural gibi türevleri sitotoksik (Naessberger, 1990), genotoksik (Bruce ve ark., 1993), mutajenik ve karsinojenik (Lee ve ark., 1995; Surh ve ark., 1994; Surh ve Tannenbaum, 1994; Zhang ve ark., 1994) özellik göstermesinin yanı sıra kolon, karaciğer ve deri kanserini tetikleyici etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Glatt ve ark., 2005; Janzowsk ve ark., 2000; Archer ve ark., 1992; Miller, 1994). Bu yüzden gıdalarda HMF düzeyinin yüksek doğrulukla belirlenmesi önemlidir.

Gıda endüstrisinin temel problemlerinden birisi de süt bazlı mamaları birbirleriyle interaksiyona girebilecek birçok bileşik içermesi nedeniyle stabilitesinin kontrolüdür. Bu ürünler, yüksek oranda şeker ve protein içermesi nedeniyle sadece üretim aşamasında değil uzun süreli depolama boyunca da Maillard reaksiyonuna karşı hassas bir durumdadırlar (Block ve ark., 2003). Maillard reaksiyonu sonucunda oluşan HMF miktarının bebek mamalarında belirlenmesi önemlidir.

Bebek mamalarında Albala-Hurtado ve ark. (1997) tarafından öngörülen metod ile tespit edilen HMF miktarı; serbest HMF ve toplam HMF olarak ifade edilmektedir. Toplam HMF kavramının, serbest HMF, proteine bağlı HMF ve HMF öncül maddelerini kapsadığı ileri sürülmüştür (Albala-Hurtado ve ark., 1999; Ferrer ve ark., 2002; Ferrer ve ark., 2005; Albala-Hurtado ve ark., 1998; Guerra –Hernandez ve ark., 2002a; Guerra –Hernandez ve ark., 2002b). Yapılan diğer çalışmalarda (Chavez-Servin ve ark., 2006a; Chavez-Servin ve ark., 2005) ise toplam HMF kavramının yerine potansiyel HMF kavramının kullanılmasının gerekliliği vurgulanmıştır. Bu çalışmalarda toplam HMF, HMF öncül maddelerin (amadori ürünleri gibi proteine bağlı HMF; şekerlerden kaynaklı oluşan HMF veya novo HMF) ve serbest HMF' nin toplamı olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı bebek maması gibi toz gıdalarda toplam veya potansiyel HMF tespitinde bağlı HMF' nin proteinden ayrılması için gerçekleştirilen ısı ve asit uygulamasının etkisinin incelenmesidir.

Gerek potansiyel HMF ve gerekse toplam HMF kavramlarının kullanıldığı çalışmalarda; proteine bağlı olarak bulunan HMF' yi serbest hale geçirmek suretiyle tespitinin yapılması için belli konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine 0.3 N okzalik asit ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 25 dk boyunca bekletilmektedir. Geleneksel metod içinde uygulanan bu işlemlerin gıdada mevcut bağlı HMF' yi serbest hale geçirmediği ayrıca toz gıda bünyesindeki şeker ve proteinlerin birbirleri ile reaksiyona girerek yöntem sırasında HMF oluşumuna neden olduğu böylece geleneksel metodun HMF miktarının doğru bir şekilde yansıtamadığı düşünülmektedir. Geleneksel metodun eksik kısımları incelenerek alternatif bir yöntem oluşturulması gerekliliğinden hareketle Carez I ve Carez II kimyasalları kullanılarak çöktürme işleminin sağlandığı ve ısı uygulamasının olmadığı modifiye bir metod alternatif olarak sunulmuştur.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Gıdalarda Esmerleşme Reaksiyonları

2.1.1. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonları

Çoğu meyve ve sebzelerin gerek hasatı gerekse de taşınması sırasında gerçekleşen bazı fiziksel zedelenme neticesinde veya söz konusu meyve ve sebzelerin herhangi bir ürüne işlenmesinde uygulanan ezme, doğrama ve parçalama gibi işlemler sonrasında renkte esmerleşme ve gıdada bozulmalar meydana gelmektedir (Yemenicioğlu ve Cemeroğlu, 1998). Gıdada rengi etkileyen bu durumun nedeni polifenol oksidaz enzim (PPO) aktivitesidir (Lee ve ark., 1991; Fujita ve ark., 1991). PPO enzimleri, oksidoredüktaz enzim grubunda yer alan enzimlerdir (Vamos-Vigyazo, 1981). Esmerleşme ile sonuçlanan bu durum enzimatik bir mekanizmadır ve iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Bunlardan birisi krezolaz aktivitesi olarak ifade edilen, monofenol monooksijenaz enzimi ile gerçekleşen monofenolik bileşiklerin o-difenollere hidroksilasyonudur. Diğer yol ise (kateşolaz aktivitesi) difenol oksidaz enzimi ile gerçekleşen o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (Sıddıq ve ark., 1992). PPO enzimleri sadece gıdanın renginde bozulmaya neden olmasının yanı sıra gıdanın diğer duyuşal özelliklerini de etkilemektedirler (Ponting ve ark., 1954). PPO enzimleri tarafından gıdada meydana gelen söz konusu etkilerin sınırlandırılması veya önlenmesi amacıyla çok çeşitli araştırmalar yürütülmüştür (Lee ve ark., 1991; Sıddıq ve ark., 1992; Tate ve ark., 1964; Valero ve ark., 1988; Dijkstra ve Walker, 1991; Zhou ve Feng, 1991). Meyve ve sebzelerde PPO enziminin nitelikleri birbirinden farklı olmasının yanı sıra (Vamos-Vigyazo, 1981) aynı tür meyve ve sebzelerde bile PPO enziminin özellikleri yetiştirme koşulları ve olgunluk aşamasına göre farklı olabilmektedir (Williams ve ark., 1986; Vamos-Viglazo ve Mihalyi, 1976).

2.1.2. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Protein, karbonhidrat, yağ, su, vitaminler ve mineral maddeler gıdaların kimyasal kompozisyonlarını oluşturmaktadır. Gerek ısı uygulamaları sırasında protein ve karbonhidratlar arasında gerekse de bileşenlerin kendi içlerinde birtakım reaksiyonlar gerçekleşmektedir (Ferrer ve ark., 2002). Bu reaksiyonlar karamelizasyon, askorbik asit

degradasyonu, maillard reaksiyonu ve pigment parçalanması gibi reaksiyonlardır (Ekici, 2005).

2.1.2.1. Maillard Reaksiyonları

Karboniller ve aminler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu; gıdanın stabilitesi, tat gelişimi, besinsel özelliklerinin yanı sıra insan sağlığı üzerinde de büyük bir rol oynamaktadır (Waller ve Feather, 1983; Fujimaki ve ark., 1986; Finot ve ark., 1990; Labuza ve ark., 1994). Gıda endüstrisi açısından değerlendirildiğinde gıdada meydana gelen bu reaksiyonun rol oynadığı etkenleri olumlu ve olumsuz sonuçları açısından değerlendirmek mümkündür.

-Renk oluşumu: Karamel, çikolata, bira ve ekmek üretiminde kontrollü esmerleşme istenen bir durum iken glikoz şurubu üretiminde ve çoğu orta nemli gıdada istenmeyen bir durumdur (Danehy, 1986).

-Tat ve aroma gelişimi: Bu reaksiyon ile gıdada istenemeyen tat ve aroma oluşabileceği gibi (Hodge, 1967; Hodge, 1972; Eichner ve Ciner-Doruk, 1981) etin kızartılması gibi durumlarda da istenen tat ve aroma oluşumu gerçekleşmektedir (O'Brein ve Morrissey, 1989).

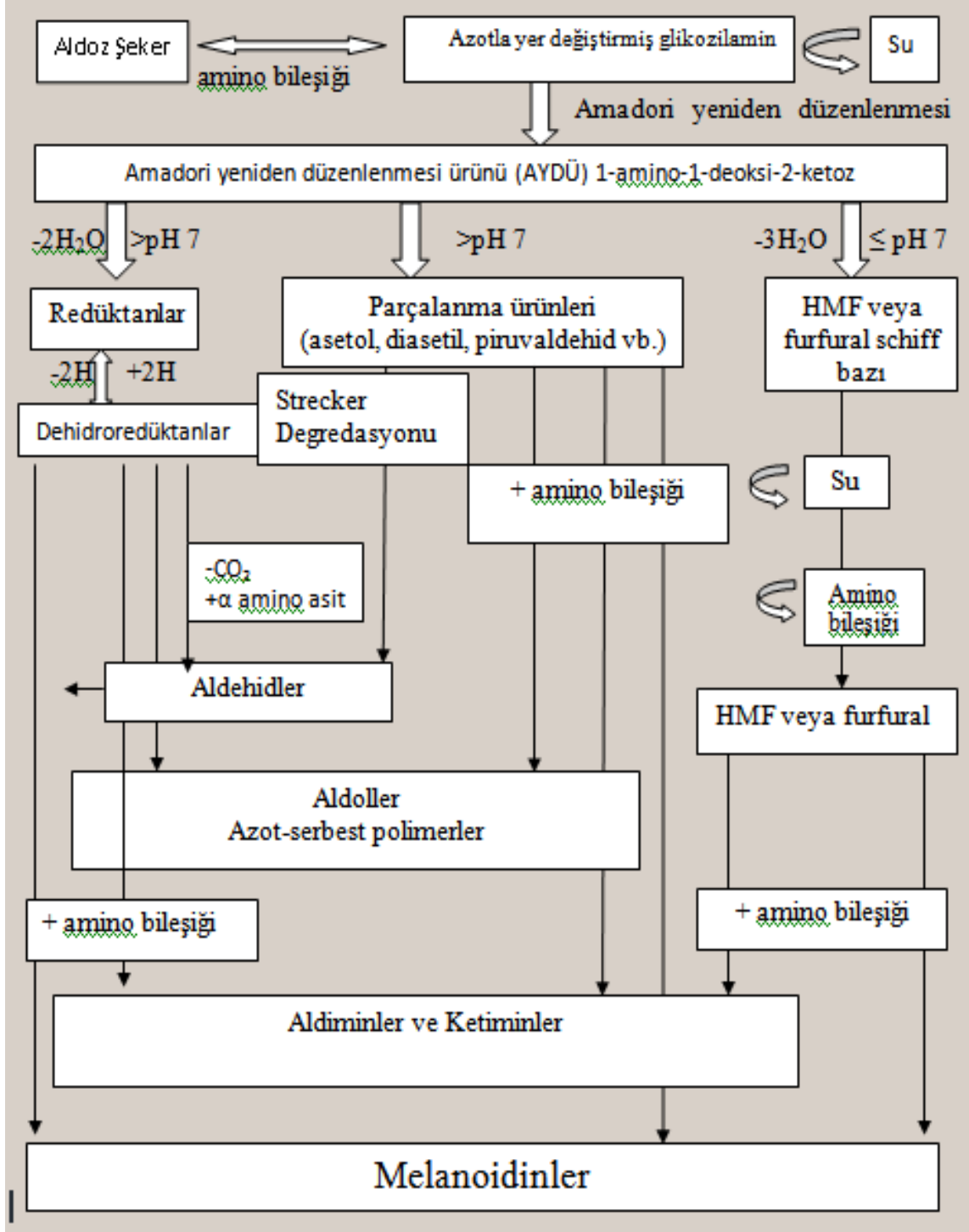
-Besin değerindeki kayıplar: Gıdada meydana gelen Maillard reaksiyonu, mevcut esansiyel aminoasitlerin parçalanmasına neden olmasıyla besin değerinde kayıplara yol açmaktadır (O'Brein ve Morrissey, 1989).

-Toksik bileşiklerin oluşumu: Reaksiyon sırasında ve sonrasında meydana gelen bazı bileşikler mutajenik aktiviteye sahiptir (Kolpe ve ark., 2002).

Aminoasitler ile karbonhidratlar arasındaki reaksiyon, ilk olarak Ling tarafından 1908 yılında biradaki renk değişimleri göz önünde bulundurularak ifade edilmiştir. Buna karşın söz konusu reaksiyona ismini veren kişi Louis Camille Maillard olmuştur. Fransız kimyacı glisin ve glikoz karışımına ısı işlem uygulayarak sarı renkten kahverengi renk oluşumunu değerlendirmek suretiyle bu reaksiyonu incelemiştir (Namiki, 1988; Friedman, 1996). Maillard reaksiyonunun gerçekleşme mekanizması (Şekil 2.1) ise 1953 yılında Hodge tarafından ortaya konulmuştur (Hodge, 1953).

Maillard reaksiyonunun zincirleme ve karmaşık olarak ilerlemesi sonucunda furfuraler ortaya çıkmaktadır. Maillard reaksiyonunun ileri aşamalarındaki pigmentlerin (melanoidinler) oluşumundaki ara ürünler furfuralerdir (Morales ve ark., 1992). Bu furfural grupların içinde

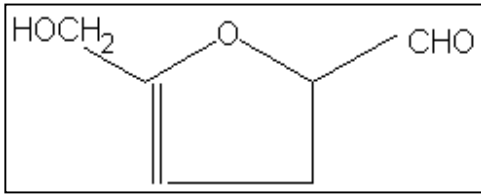
en yaygın olarak bilinen 4 değişik bileşik bulunmaktadır; hidroksimetilfurfural (HMF), furfural (F), furil-metilseton (FMC) ve metilfurfural (MF). Bu bileşikler Maillard reaksiyonunun derecesi hususunda kalite indikatörü olarak kullanılabilir (Guerra-Hernandez ve ark., 1992; Lo Coco ve ark., 1992; Albala-Hurtado ve ark., 1998).



Şekil 2.1. Maillard reaksiyonu oluşum mekanizması (Hodge, 1953)

2.1.2.2. Karamelizasyon

Karamelizasyon, ortamda amino grubu bulunmaksızın karbonhidratların yüksek sıcaklığa maruz kalmasıyla meydana gelen bir dizi reaksiyondan oluşmaktadır. Bu reaksiyonu etkileyen unsurlar; pH ve solusyonun karbonhidrat konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir (Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve Vercellotti, 2000; Lowary ve Richards, 1988; Mauch, 1971; Richards, 1986; Vukov, 1965). Yüksek konsantrasyona sahip bir sükroz çözeltisi nötr bir pH' da yüksek sıcaklıklara kadar ısıtıldığında, sükroz parçalanması meydana gelmektedir (Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve ark., 1996; Lowary ve Richards, 1988; Richards, 1986). Bu tip çözeltiler şekerleme sanayi veya beyaz şeker üretiminde şeker kaynatılması sırasında açısından özel bir öneme sahiptir. Karamelizasyon reaksiyonunun ilk basamağında sükroz parçalanması, ardından da glikoz ve fruktoz üretimi meydana gelmektedir (Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve ark., 1996; Lowary ve Richards, 1988; Mauch, 1971; Richards, 1986). Bu ürünlerin ileri parçalanmaları, özellikle ısıya dayanıklı 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) ve diğer bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır (Antal ve ark., 1990; Clarke ve ark., 1997; Eggleston ve ark., 1996; Kroh, 1994; Lowary ve Richards, 1988; Mauch, 1971). Ayrıca heksozun direkt olarak ısıtılması sonucunda da HMF oluşumu (Şekil 2.17) tespit edilmiştir (Lee, 1983).



Şekil 2.18. Karamelizasyon sırasında meydana gelen 5-hidroksimetil-furfural (HMF)

2.1.2.3. Askorbik Asit Oksidasyonu

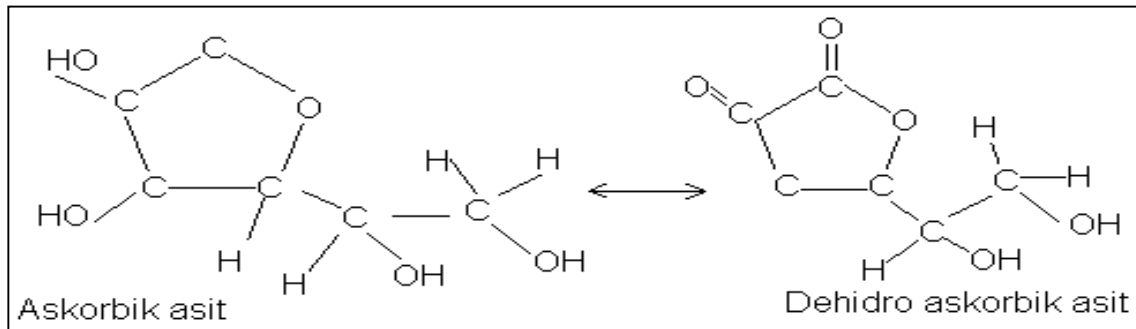
Askorbik asit, bitkisel kaynaklı gıdaların içerdiği temel vitamin olup en zengin askorbik asit kaynakları olarak en fazla kuşburnu meyvesi olmak üzere turuncgiller, domates, yeşilbiber ve lahana sayılabilir (Cemeroğlu, 2007). Askorbik asit, gıdanın işlenmesi ve depolanması sırasında oksidasyon nedeniyle ve yüksek sıcaklıklarda ısı yolla (Cemeroğlu,

2007) çabuk parçalanabilen bir vitamindir (Keleş ve Kökosmanlı, 1996). Askorbik asit değişken olarak ısı işlemlere bir dereceye kadar dayanıklıdır ancak oksijenin varlığındaki depolanma sırasında çabuk bir şekilde kaybı söz konusudur (Burton, 1984). Askorbik asit gıdalarda genellikle besleyicilik kalitesinin göstergesi olarak kabul edilir. Çünkü askorbik asit gıdalarda bulunan diğer besin bileşenlerine göre çabuk değişebilen bir yapıya sahiptir (Le Maguer ve Jelen, 1986; Lee ve Kader, 2000; Rojas ve Gerschenson, 2001; Erentürk ve ark., 2005). C vitamini seviyesindeki düşmeler çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar; oksijen içeriği, metal iyonu katalizi, ışık, sıcaklık ve nem içeriğidir (Rojas ve Gerschenson, 2001).

Ayrıca gıdaların işlenmesi, depolanması ve pişirilmesinde en fazla kaybolan vitamin askorbik asittir. Çeşitli işlemlere bu kadar duyarlı olması nedeniyle, gıdalara uygulanan birçok işlemin olumsuz etkisinin belirlenmesinde askorbik asitteki kayıp miktarı bir ölçüt olarak kullanılmaktadır (Cemeroğlu, 2007).

Depolama sıcaklığı, depolama süresi, ışık ve oksijene maruz kalma durumu parçalanma hızına etki etmektedir. Sıralanan faktörlerinin miktarı arttıkça, parçalanma hızı da artmaktadır (Keleş ve Kökosmanlı, 1996).

Askorbik asitin parçalanması genel olarak oksidatifdir, ancak oksidatif olmayan askorbik asit bozulması da mevcuttur. Ayrıca askorbik asitin en stabil olduğu pH değeri 6' dır. Güçlü asidik koşullarda gerçekleşen bozulma reaksiyonunun temel ürünü furfurallerdir (Namiki 1988). Amino asitlerin varlığı askorbik asit parçalanmasını hızlandırmaktadır . L-askorbik asit kolaylıkla ve dönüşümlü olarak dehidro askorbik asite dönüşür (Şekil 2.27) (Cemeroğlu ve ark., 2001).



Şekil 2.27. Askorbik asit ve dehidro askorbik asitin kimyasal yapısı

Dehidro askorbik asit gibi amin varlığında furfural ve kahverengi pigment oluşumu yönündeki reaksiyonda reaktif olarak rol oynamaktadır. Çalışmalar L-askorbik asit parçalanmasının duraldehid ve hidroksimetilfurfural (HMF) oluşumuyla sonuçlandığını ifade

etmektedir (Roig ve ark. 1999). Asit katalizlenmesi ile gerçekleşen oksidatif koşullardaki portakal suyu kararmasında askorbik asitin kısmen sorumlu olduğu belirtilmiştir (Handwerk ve Coleman, 1988). Ayrıca meyve sularında pH 4.0' ün altında gerçekleşen esmerleşmenin askorbik asitin furfurallere parçalanmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Eskin, 1990).

2.2. Gıdalarda 5-HMF Oluşumu

Maillard Reaksiyonu ara ürünlerinden en yaygın olanı 5-Hidroksimetilfurfural' dir (Friedman, 1996; Tomlinson, 1993; Berg ve Boekel, 1994). Çok karmaşık bir zincir reaksiyon mekanizmasının sonucu oluşan HMF' nin (Kroh, 1994; Ciolino, 1988; Mendoza ve ark., 2002) yapılan çalışmalarda 30 farklı türevinin bulunduğu bildirilmektedir (Lewkowski, 2001). HMF, çoğu karbonhidratça zengin gıdada Maillard Reaksiyonun ilk basamaklarında meydana gelen bir belirteçtir. Dahası bu siklik aldehit, asidik koşullar altında enolizasyon ile heksozların dehidrasyonu (Gottschalk, 1952, Kroh, 1994) ve onu takiben gerçekleşen glukozamin hidrolizasyonu (Leloir ve Cardini, 1953; Jun ve ark., 2003) sonucu meydana gelmektedir. Meyve sularının işlenmesinde uygulanan ısı işlemi belirlemek için de askorbik asitin parçalanma ürünlerinden biri olan HMF bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Burdurlu ve ark. 2006). Bundan dolayı HMF sadece Maillard reaksiyonu sonucu değil aynı zamanda amino grupların gerekli bulunmadığı heksozların parçalanması ve karamelizasyon sonucunda da oluşmaktadır (Berg ve Boekel, 1994).

Söz konusu reaksiyonlarla ortaya çıkan 5-hidroksi-2-metilfurfural ve türevlerinin (furan bileşikleri), ürün özelliklerini, depolama süresini ve uygulanan ısı işlem şiddetini gösteren olumsuz bir kalite indikatörü olarak değerlendirildiği gibi insan sağlığı açısından da ciddi risk taşıdığı belirtilmektedir (Glatt ve ark., 2005; Janzowsk ve ark., 2000; Iglesia, 1997).

2.3. 5-HMF' nin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Uzun yıllardan beri gıdalardaki mevcut HMF üzerine, HMF' nin DNA zincir kırıcı aktivitesi bulunması ve mutajenik etki göstermesi nedeniyle yapılmış mevcut çalışmalar bulunmaktadır (Omura ve ark. 1983). Dahası HMF ve 5-klorometilfurfural, 5-sülfoksimetilfurfural gibi türevleri sitotoksik (Naessberger, 1990), genotoksik (Bruce ve ark., 1993), mutajenik ve karsinojenik (Lee ve ark., 1995; Surh ve ark., 1994; Surh ve Tannenbaum, 1994; Zhang ve ark., 1994) özellik göstermesinin yan sıra kolon, karaciğer ve deri kanserini tetikleyici etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Glatt ve ark., 2005; Janzowsk ve ark., 2000; Archer ve ark., 1992; Miller, 1994). HMF' nin gıdalarda oluşumu

sonucu kalite ve besin kayıplarına yol açtığı ve daha da önemlisi belirgin olarak insan sağlığı üzerine olumsuz etkiye sahip olması çeşitli literatürlerce belirtilmiştir (Ferrer ve ark., 2005; Ferrer ve ark., 2002; Block ve ark., 2003).

2.4. Bebek Mamalarında 5-HMF Tespiti Üzerine Çalışmalar

Gıda endüstrisi, bebek mamalarının içeriğini insan sütüne benzer düzeye getirebilmek için çaba sarfetmektedir (Ferreira ve ark. 1998). Sadece bebek maması değil bunun yanı sıra yetişkinler için de (hamile bayanlar vb.) toz gıdaya yönelik zengin besin formülasyonları geliştirilmektedir (Guesry, 1998; Agostini ve ark., 1999; Xiang ve Zettstrom, 1999; Neuringer, 2000; Jeffery ve ark., 2001). Süt bazlı formülasyonlar değişik oranlarda protein, karbonhidrat, yağ, mineral ve vitaminler karışımına göre hazırlanmaktadır. Sprey kurutma sayesinde sütün süt tozuna işlenmesiyle de bebek mamasının birkaç günlük olabilecek raf ömrü 18-24 aya kadar uzatılabilmektedir (Özkan ve ark., 2003; Kockel ve ark., 2002).

Gıda endüstrisinin temel problemlerinden birisi de süt bazlı mamalarının birbirleriyle interaksyona girebilecek birçok bileşik içermesi nedeniyle ürün stabilitesinin kontrolüdür. Bu ürünler yüksek oranda şeker ve protein içermesinden dolayı sadece üretim aşamasında değil uzun süreli depolama boyunca da Maillard reaksiyonuna karşı hassas bir durumdadırlar (Block ve ark., 2003).

Ferrer ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada ayarlanmış süt bazlı bebek maması ve kontrol süt bazlı bebek maması örnekleri analiz edilmiştir. Örnekler, inek sütünün pastörize (72 °C' de 15 saniye) edilmesinin ardından düşen film evaporatörde (5 dakika / 85, 66 ve 58 °C) konsantre edilmiş ve ardından sterilizasyon işlemi (100 °C' de 22 saniye) uygulanmıştır. Konsantre sütün de içinde bulunduğu pastörize peynir altı suyu, yağ, laktoz ve mineraller maddelerden oluşan karışım sprey kurutucuda kurutulmuştur. Örneklerin kimyasal kompozisyonu ayarlanmış örnekler için % 11.6 protein (kazein / serum proteinleri, 40 / 60), % 55 karbonhidrat (laktoz), % 28 yağ olup kontrol örnekleri için kimyasal kompozisyon ise % 16 protein (kazein/serum proteinleri, 80/20), %54 karbonhidrat (% 32.4 laktoz + % 21.6 maltodekstrin), % 24 yağ olarak belirlenmiştir. Örnekler 20 ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta 12 ay boyunca depolanmıştır. Örneklerin üretim anında ve depolama süresi boyunca (3, 6, 9, ve 12. aylarda) serbest ve toplam HMF analizleri yapılmıştır. 20°C' de depolanan ayarlanmış örneklerdeki (100 g) serbest HMF değerleri üretim sonrasında ve depolamanın sırasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 97.06, 126.27, 113.41, 37.82, 123.26 µg olarak tespit edilmiştir. 37 °C' de depolanan ayarlanmış örneklerdeki (100 g) serbest HMF değerleri

Üretim sonrasında ve sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 97.06, 136.5, 176.91, 87.99, 214.54 µg olarak belirlenmiştir. 20°C’ de depolanan kontrol örneklerindeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve depolamanın sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 474.03, 443.27, 458.87, 380.53, 553.29 µg olarak tespit edilmiştir. 37°C’ de depolanan kontrol örneklerindeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 474.03, 505.5, 499.77, 450.52, 623.67 µg olarak bulunmuştur. 20°C’ de depolanan ayarlanmış örneklerdeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve depolmanın sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 570.07, 230.95, 537.30, 438.32, 234.8 µg olarak tespit edilmiştir. 37°C’ de depolanan ayarlanmış örneklerdeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve depolamanın sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 570.07, 297.68, 658.04, 668.33, 396.6 µg olarak belirlenmiştir. 20°C’ de depolanan kontrol örneklerindeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve depolamanın sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 1291.35, 702.67, 1137.60, 997.19, 674.04 µg olarak tespit edilmiştir. 37°C’ de depolanan kontrol örneklerindeki (100 g) serbest HMF değeri üretim sonrasında ve depolamanın sirasıyla 3, 6, 9, ve 12. aylarında, 1291.35 , 810.17, 1435.04, 1158.56 µg ve 888.24 µg olarak belirlenmiştir.

Ferrer ve ark. (2005) tarafından yapılan araştırmada; bebek maması örneklerindeki (ayarlanmış ve kontrol) Maillard reaksiyonunun boyutunu ortaya koyabilmek amacıyla furfural bileşiklerin (2-furaldehid, 5-hidroksimetil-2-furfuraldehid, 2-furilmetilketon ve 5-metil-2-furaldehid) tespiti üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada örnekler raf ömrü olan iki yıl boyunca farklı sıcaklıklarda (20 ve 37°C) depolanmak suretiyle 15, 18, 21 ve 24. aylarda furfural bileşiklerinin analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda 20°C’ de depolanan ayarlanmış örnekteki serbest HMF miktarları (µg / 100g örnek) sirasıyla (15, 18, 21, 24. aylarda) 92, 148, 62, 211 iken kontrol örnekteki serbest HMF miktarı 475, 425, 477, 1042 olarak, toplam HMF ise ayarlanmış örnekte 499, 392, 481,1089 iken kontrol örnekte 1114, 866, 1314, 2102 olarak tespit edilmiştir. İkinci sıcaklık olarak seçilen 37°C ‘de depolanan ayarlanmış örnekteki serbest HMF miktarları (µg / 100g örnek) sirasıyla (15, 18, 21, 24. aylarda) 187, 224, 174, 342 iken kontrol örnekteki serbest HMF miktarı 539, 523, 612, 1133 olarak, toplam HMF ise ayarlanmış örnekte 857, 645, 893,1738 iken kontrol örnekte 1649, 1273, 1367, 2909 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacıların önceki çalışmasının (Ferrer ve ark., 2002) depolama süresi bakımından devamı niteliğinde olan bu çalışmada, bebek maması örnekleri raf ömrünün sonuna kadar depolanmıştır. Serbest ve toplam furfural bileşikleri arasında gözlemlenen korelasyon neticesinde bebek mamalarının depolanmasında sıcaklık ve

süre kontrolünün bu ürünlerdeki Maillard reaksiyonunun ilerlemesi açısından önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Ancak depolama süresinin furfural bileşikleri üzerinde devamlı bir etki şeklinde olmadığını ayrıca raf ömrünün son aşaması olarak ele alınabilecek ikinci yılın furfural bileşiklerin raf ömrü boyunca gösterdiği davranışları aydınlatmada yararlı olmadığını ileri sürmüşlerdir. Besinsel kalitesi açısından bebek maması gibi ürünlerin depolama süresinin bir yıl ve mümkünse daha az bir süreç olması gerekliliğinin üzerinde durmuşlardır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Araştırmada kullanılan model bebek maması örnekleri, yöntem optimizasyonu için kullanılan yardımcı maddeler ve analizlerde kullanılan kimyasal maddeler hakkındaki bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Optimizasyon İçin Kullanılan Standart Maddeler

Yöntem optimizasyonu için kullanılan standart maddeler; gluten, kazein, maltodekstrin, galaktoz, fruktoz, dekstroz, nişasta, peyniraltı suyu tozu-PST, guar gum, ksantan gum, karragenann(Sigma), inülin (Neelikon), gum arabik, sakaroz, standart hifroksimetilfurfural-HMF, glukoz (Merck) şeklindedir.

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler; okzalik asit, trikloro asetik asit-TCA, asetonitril, CarezI-CarezII, etanol (Merck) ve asetik asit (Carlo Erba Reagents) şeklindedir.

3.1.3. Bebek Mamaları

Bu çalışmada üç farklı firmadan değişik içeriklere sahip (sütlü pirinçli, peynirli pekmezli, sütlü yulaflı buğdaylı, sütlü tahıllı ek besin muzlu buğdaylı, sütlü pirinç unu elmalı, 8 tahıllı ballı, ballı irmikli, 7 tahıllı, sütlü peynirli pekmezli) toplam 11 ticari bebek maması örneği kullanılmıştır. Örnek alma işlemi iki kez yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma sırasında kullanılan cihazlar; pH metre (İnolab Level 3, Almanya), yakma düzeneği (Büchi Digest System K-437), destilasyon düzeneği (Büchi Distillation Unit B-324), Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi-DAD (HPLC-DAD, Agilent 1100 Series, Manual injection quaternary pump, thermostatted column compartment, Diode Array and Multiple Wavelength Detectors, U.S.A), Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi-RID (HPLC-RID, Agilent 1100 Series, Manual injection quaternary pump, thermostatted column compartment, Refractive Index Detector, U.S.A), vorteks (IKA-Genius 3), kaynar su banyosunda (Memmert-çalkalamalı), santrifüj (Nüve 800 R), mikro enjektör (Hamilton-50 µL).

3.3. Yöntem

3.3.1. Model Sistemde HMF Analiz Yönteminin Optimizasyonu

3.3.1.1. Bağlı HMF Analizi

HMF' nin proteine bağlanma durumunu incelemek üzere standart HMF' den 131.89 ppm (mg /L) düzeyinde standart HMF çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözelti içerisinde standart kazein ve gluten tartılarak % 2.5, 5, 10 olmak üzere üç farklı konsantrasyonlarda kazein ve gluten içeren homojen kazein-HMF ve gluten-HMF karışımları elde edilmiştir. Bu karışım setlerinden birincisine herhangi bir ısı ve asit uygulaması yapılmamıştır. Diğerleri ise 25 dk süreyle su banyosundan bekletilmiş ve 0.15M okzalik asit eklenmesi suretiyle de asit eklenerek gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada bu karışım setlerinde HMF analizi (Ferrer ve ark., 2002) yapılmıştır.

3.3.1.2. Model Sistem Bileşenlerinde HMF Analizi

Toz gıdaların bünyesinde bulunan başlıca bileşenlerden (ksantan gum, karregenan, guar gum, gum arabik, inülin, nişasta, dekstroz, fruktoz, galaktoz, maltodekstrin, glukoz, sakkaroz) standart % 2 ve 1' lik 2 farklı konsantrasyonda homojen çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerde bağlı HMF analizinde olduğu gibi Ferrer ve ark. (2002) tarafından önerilen HMF analizi uygulanmıştır.

3.3.1.3. Protein-Şeker Kombinasyonlarında HMF Analizi

Üç farklı şekerden (sakkaroz, fruktoz ve glukoz) hazırlanan % 2' lik çözeltiler kullanılarak % 2, 1, 0.5, 0.25' lik protein (kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu) kombinasyonları hazırlanmıştır. Bu kombinasyonlarda HMF analizi yapılmıştır (Ferrer ve ark., 2002).

3.3.2. Bebek Maması Kimyasal Analizleri

Araştırma materyali olarak seçilen 3 farklı firmadan alınan ilk 11 adet bebek maması örneklerinde pH, kurumadde, protein, HMF analizleri, ikinci defa alınan 11 adet örnekte ise şeker ve HMF analizleri yapılmıştır.

3.3.2.1 pH Değeri

% 10' luk çözeltisi hazırlanan bebek maması örnekleri, standart tampon çözeltileri ile kalibre edilmiş pH metre kullanılarak belirlenmiştir (Dokuzlu, 2004).

3.3.2.2. Kuru Madde Tayini

Bebek maması örneklerinde kuru madde tayini için, 105°C' ye ayarlanmış etüv kullanılarak kurutulan metal kuru madde kapları desikatöre alınarak soğutulmuştur. Sabit tartıma getirilen petrilerin daraları (G) hassas terazi yardımıyla alındıktan sonra bebek maması örneklerinden yaklaşık 3-5 g tartılmıştır (G₁). Bir sonraki aşamada kuru madde kaplarındaki örnekler 105°C' de yaklaşık 2 saat bekletilmiş ve sabit ağırlığa gelinceye kadar etüvden alınıp desikatöre konularak tartım yapılmıştır (G₂). Kurumadde miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (AOAC, 1990).

$$\% \text{ Nem} = \left[\frac{(G_2 - G)}{(G_1 - G)} \right] * 100 \quad \% \text{ Kurumadde} = 100 - \text{Nem}$$

3.3.2.3. Protein Tayini

Toplam protein tayini, yakma düzeneği ve otomatik destilasyon düzeneği kullanılarak Kjeldahl yöntemine göre yapılmıştır. Örnekteki toplam azot miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Yüzde protein miktarı ise toplam azot miktarının 6.38 protein faktörü ile çarpılması ile hesaplanmıştır (AOAC, 1980).

$$\% \text{ Toplam Azot} = \frac{\text{Harcanan 0.1 N HCl (mL)} \times \text{Faktör} \times 0.0014}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100$$

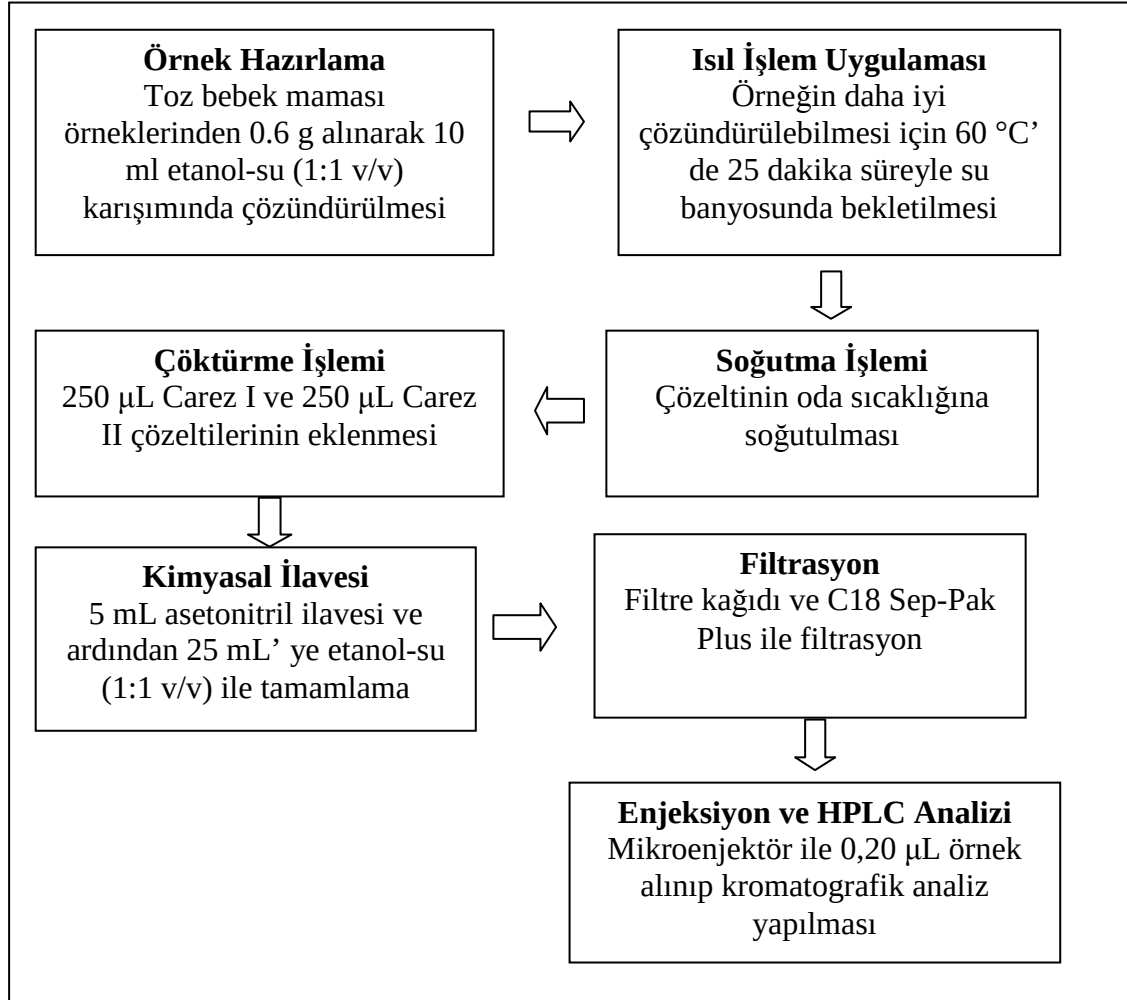
3.3.2.4. Şeker Analizi

Bu amaçla Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi kullanılmış olup şeker analizindeki kromatografi koşulları Çizelge 3.1 'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Bebek mamalarında şeker analizinde uygulanan kromatografi koşulları

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	HPLC-RI, manuel enjeksiyon dörtlü pompa, temostatlı kolon bölümü, Refraktif İndeks Dedektör, U.S.A
Kolon	Ortam 30 °C'de sabit tutulmuştur. Kullanılan kolon amin kolondur
Mobil faz	75:25, asetronitril : ultra saf su (% 1' lik asetik asit ile asitlendirilmiş)
Akış hızı	2 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Enjeksiyon bloğu	Rheodyne enjeksiyon bloğu

HPLC yöntemiyle yapılan analiz için Shavez-Servin ve ark. (2004) tarafından belirlenen metod kullanılmıştır (Şekil 3.1). Toz bebek maması örneklerinden 0.6 g tartıldıktan sonra 10 mL etanol-su karışımına (1:1 v/v) eklenerek karıştırılmış ve homojen bir yapı kazanması sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada örneğin daha iyi çözünebilmesi için 60 °C’ de 25 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler çöktürme işlemi için 0.25 mL Carez I ve 0.25 ml Carez II eklenmiştir. Karışım üzerine 5 mL asetonitril ilavesinden sonra 25 mL’ lik hacim etanol-su (1:1 v/v) karışımı ile tamamlanmıştır. Filtre kağıdı ve C 18 Sep-Pak plus ile filtrasyon yapılmasının ardından mikroenjektör ile 0.20 µL örnek alınarak kromatografik analiz yapılmıştır.



Şekil 3.1. Bebek mamalarında şeker analizinde örnek hazırlama aşamaları

3.3.2.5. HMF Analizi

Bu çalışmada bebek maması örneklerinde HMF analizleri geleneksel ve modifiye metod olmak üzere iki farklı metod kullanılarak kromatografik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.5.1. Geleneksel HMF Analizi

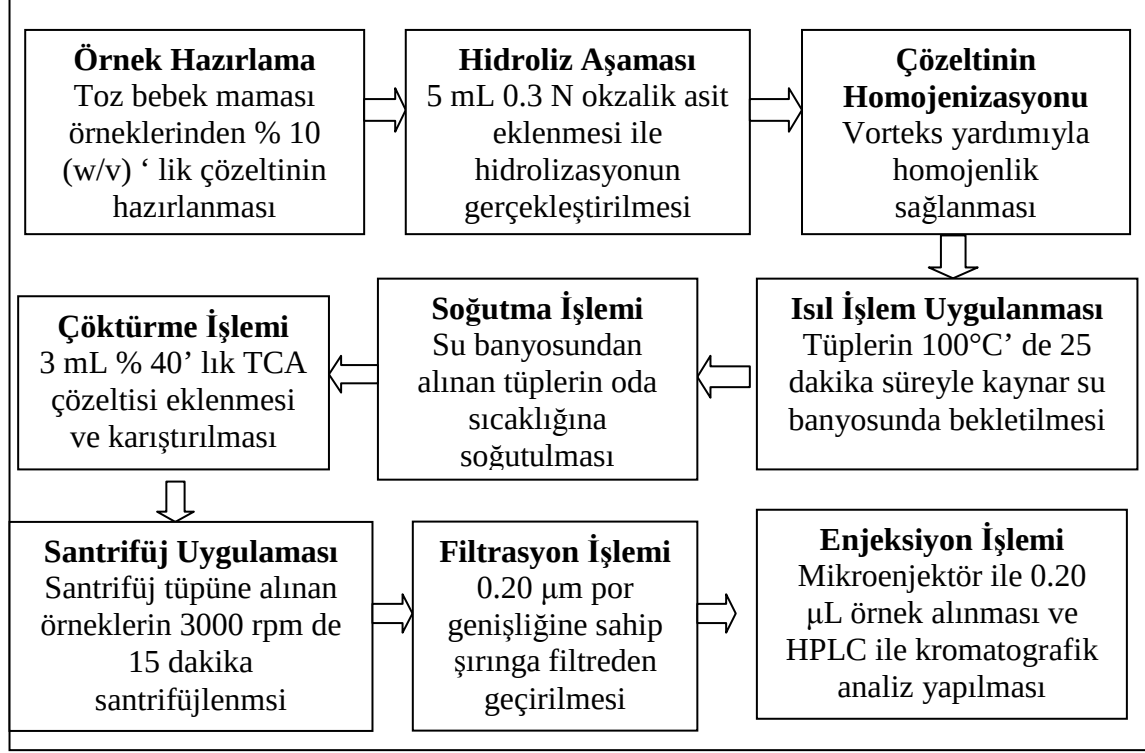
Bu amaçla Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi kullanılmış olup HMF analizindeki kromatografi koşulları Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Geleneksel HMF analizinde uygulanan kromatografi koşulları

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	HPLC-DAD, manuel enjeksiyon dörtlü pompa, temostatlı kolon bölümü, Diyod Dizi ve Çoklu Dalgaboylu Dedektör, U.S.A
Kolon	Ortam 25 °C'de sabit tutulmuştur. Kullanılan kolon 4.6x250 mm boyutlarında, dolgu malzemesi 5 µm çapında oktadesilsilan modifiye silika olan ACE-121-2546 C ₁₈ kolondur.
Mobil faz	5:95, asetonitril : ultra saf su (% 1' lik asetik asit ile asitlendirilmiş)
Sistem Basıncı	132 bar
Dalga boyu	284 nm
Akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Enjeksiyon bloğu	Rheodyne enjeksiyon bloğu

HPLC yöntemiyle yapılan analiz için toz bebek maması örneklerinden % 10 'luk çözelti (w/v) hazırlanarak homojen bir yapı kazandırılmıştır. Herhangi bir şekilde dışarıya çözelti ve buhar kaçmaması için sızdırmayan deney tüplerine 15 mL örnek alındıktan sonra üzerine günlük hazırlanan 5 mL 0.3 N oksalik asit eklenmiştir. Bir sonraki aşamada vorteks yardımıyla iyi bir karışım sağlanmıştır. 100°C 'de kaynar su banyosunda 25 dk süreyle bekletildikten sonra tüpler oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutulan tüplere 3 mL %40' lık TCA çözeltisi eklenip iyi bir karışım sağlanması açısından vorteks kullanılarak karıştırılmıştır. Santrifüj tüplerine alınan çözelti 3000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüjlenerek iki fazın ayrılması sağlanmıştır. Çözeltinin supernatant kısmı alınarak 0.20 µm por genişliğine sahip şırınga filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen ve ejeksiyona hazır

hale getirilen örnekten mikro enjektör ile 0.20 μL alınarak enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşamaları Şekil 3.2 'de verilmiştir.

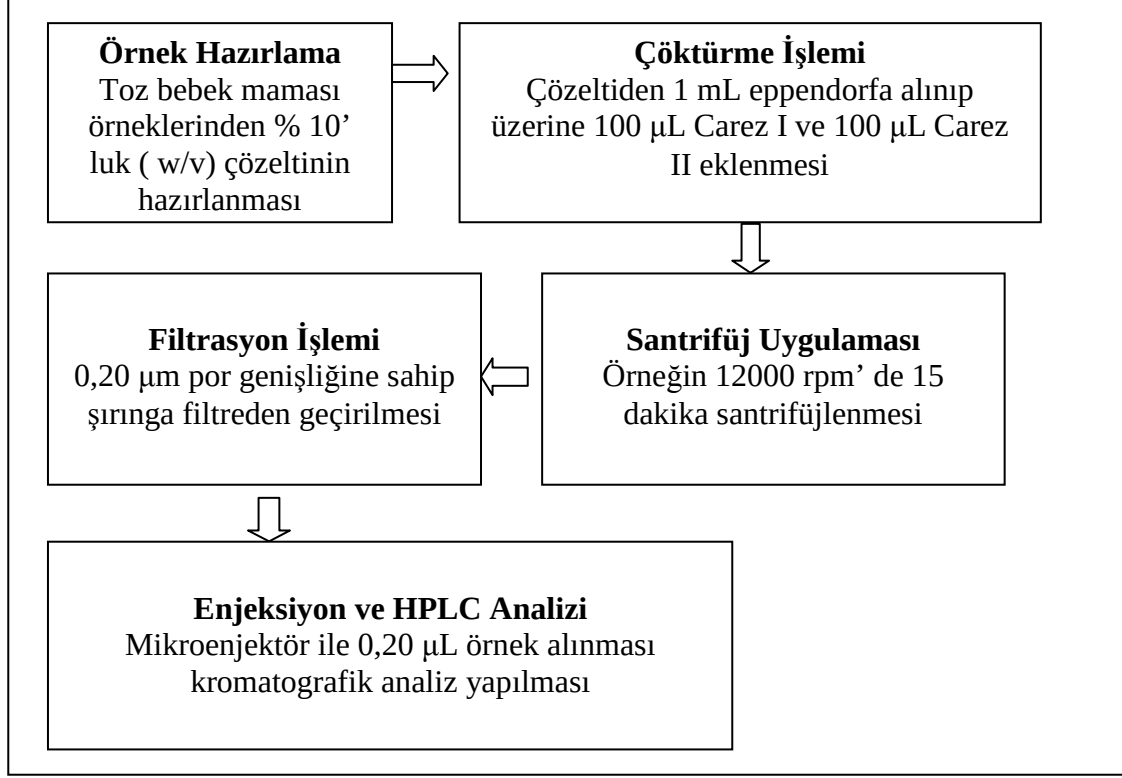


Şekil 3.2. Geleneksel HMF analizinde örnek hazırlama aşamaları

3.3.2.5.2. Modifiye HMF Analizi

Bu amaçla Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi kullanılmış olup HMF analizindeki kromatografi koşulları Çizelge 3.1.' de belirtilmiştir.

HPLC yöntemiyle yapılan analiz için toz bebek maması örneklerinden % 10' luk çözelti (w/v) hazırlanıp vorteks yardımıyla iyi bir karışım sağlanarak homojen bir yapı kazandırılmıştır. 12000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüjlenerek iki fazın ayrılması sağlanmıştır. Çözeltinin supernatant kısmı alınarak 0.20 μm por genişliğine sahip şırınga filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen ve ejeksiyona hazır hale getirilen örnekten mikro enjektör ile 0.20 μL alınarak enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşamaları Şekil 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3. Modifiye HMF analizinde örnek hazırlama aşamaları

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Model Sistemde HMF Yöntem Optimizasyonu Analiz Sonuçları

4.1.1. Bağlı HMF Analiz Sonuçları

Bağlı HMF olarak nitelendirilen HMF'nin proteinlere bağlanma durumunu incelemek üzere 131.89 ppm (mg/L) düzeyinde HMF stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözelti kullanılarak % 2.5, % 5, % 10 konsantrasyonlarındaki kazein karışımında HMF analizi yapılmıştır. Stok HMF çözeltisi ile hazırlanan %10'luk kazein çözeltisini kaynar su banyosu ve asit uygulaması işlemlerine tabi tutulmadan HMF analizi (Boekel ve Rehman, 1987) yapılmış ve 116.31 ppm bulunmuştur. Geri kazanım %86.61 iken HMF'nin kazeine bağlanma oranı %13.39 seviyesinde gerçekleşmiştir. Stok HMF çözeltisi ile hazırlanan % 5 'lik kazein çözeltisini kaynar su banyosu ve asit uygulaması işlemlerine tabi tutulmadan HMF analizi yapılmış ve 122.31 ppm bulunmuştur. Geri kazanım % 92.74 iken HMF'nin kazeine bağlanma oranı % 7.26 seviyesinde gerçekleşmiştir. Diğer konsantrasyonlardaki karışımlarda olduğu gibi % 2.5 'lik kazein çözeltisini kaynar su banyosu ve asit uygulaması işlemlerine tabi tutulmadan HMF analizi yapılmış ve 127.48 ppm bulunmuştur. Geri kazanım % 96.55 iken HMF'nin kazeine bağlanma oranı % 3.45 seviyesinde gerçekleşmiştir.

131.89 ppm HMF içeren stok çözelti ile % 10 kazein içeren karışım hazırlanmıştır. Söz konusu geleneksel metoda göre yapılan analizlerde 25 dakika süresince kaynar su banyosunda uygulanan ısı işlemin yanı sıra asit uygulaması da yapılmıştır. Bu durumda 131.89 ppm düzeyinde HMF içeren karışımında bahsedilen işlemler uygulandıktan sonra tespit edilen HMF değeri 115.52 ppm olmakla beraber geri kazanım % 87.59 ve bağlanma % 12.41 şeklinde gerçekleşmiştir. %5 'lik kazein çözeltisinde 25 dakikalık ısı işlem ve asit uygulanmasını içeren yöntem uygulandığında tespit edilen HMF değeri 121.10 ppm değerinde olup geri kazanım oranı % 91.82 ve bağlanma oranı % 8.18 olarak tespit edilmiştir. Son olarak % 2.5 'lik kazein çözeltisinde 25 dakika süren ısı işlem ve asit uygulanmasını içeren yöntem uygulandığında tespit edilen HMF değeri 124.51 ppm değerinde olup geri kazanım oranı % 94.41 ve bağlanma oranı % 5.59 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca % 10 kazein

çözeltisi içeren örnek 100 dakika boyunca kaynar su banyosunda tutulmuş, ardından HMF değerine bakılmış ve sonuçta 115.27 ppm olarak, geri kazanım oranı % 87.40 olarak ve bağlanma oranı ise % 12.60 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. HMF stok çözeltisi ile hazırlanan değişik kazein konsantrasyonlarına uygulanan işlemler ve HMF ‘nin bağlanma durumları

Kazein %	Kaynar su banyosu uygulaması	Süre (dakika)	Asit uygulaması	Stok HMF (ppm)	Ortalama geri kazanım HMF (ppm)	Bağlanma (%)	Geri kazanım HMF (ppm)
10	yok	0	yok	131.89	116.31	13.39	86.61
5	yok	0	yok	131.89	122.31	7.26	92.74
2.5	yok	0	yok	131.89	127.48	3.45	96.55
10	var	25	var	131.89	115.52	12.41	87.59
5	var	25	var	131.89	121.10	8.18	91.82
2.5	var	25	var	131.89	124.51	5.59	94.41

Bağlı HMF olarak nitelendirilen HMF’ nin (Albala-Hurtado ve ark., 1997; Albala-Hurtado ve ark., 1998; Albala-Hurtado ve ark., 1999; Guerra-Hernandez ve ark., 2002a; Guerra-Hernandez ve ark., 2002b; Ferrer ve ark., 2002; Ferrer ve ark., 2005; Chavez-Servin ve ark., 2005) 25 dk süresince uygulanan kaynar su banyosu ve okzalik asit ilavesi işlemlerinin kazeine bağlı olan HMF’ nin ayrılması durumu üzerine önemli bir etkisi bulunmamaktadır. Söz konusu çalışma kazein yerine gluten kullanılarak tekrarlanmıştır ancak HMF’ nin glutene bağlanmadığı tespit edilmiştir. Kazeinin bulunduğu toz formülasyondaki gıdalarda mevcut olan bağlı HMF asit ve ısı uygulamaları neticesinde ayrılmadığından HMF analizi sonunda bulunan değere ilave olarak HMF’ nin ortalama % 10 oranında bağlanmış olabileceği göz ardı edilmemelidir.

4.1.2. Model Sistem Bileşenlerinde HMF Analiz Sonuçları

Toz gıdalar bileşiminde genel olarak kullanılan başlıca bileşenlerden oluşturulan % 2’ lik ve % 1’ lik standart çözeltilerde HMF analizi yapılmıştır. Çizelge 4.2’ de yer almayan ksantan gum ve guar gum ile hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları sırasıyla % 0.5 ve %

0.1' dir. Bunun nedeni ise bu kıvam vericilerin yapısal özelliklerinden dolayı çözelti içerisine ilave edildiklerinde çözeltiyi analiz yapılamayacak derecede kıvamlı hale getirmeleridir.

Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan model sistem bileşenlerinde HMF analiz sonuçları

% 2 Konsantrasyon	HMF (ppm)*	% 1 Konsantrasyon	HMF (ppm)
Glukoz	TE	Glukoz	TE
Maltodekstrin	TE	Maltodekstrin	TE
Galaktoz	TE	Galaktoz	TE
Fruktoz	1318.81	Fruktoz	692.18
İnülin	877.99	İnülin	425.64
Dekstroz	TE	Dekstroz	TE
Sakaroz	579.62	Sakaroz	291.23
Nişasta	TE	Nişasta	TE
Gum arabik	TE	Gum arabik	TE
Karragenan	157.14	Karragenan	80.47

*TE : tayin edilememiştir

% 2 ve % 1 olmak üzere (ksantan ve guar gum için % 0.5 ve % 0.1) farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlara uygulanan HMF analizi sonucunda % 2' lik konsantrasyonda hazırlananlarda en yüksek değer 1318.81 ile fruktozda tespit edilmiştir. % 1 oranında hazırlanan çözeltilerde ise yine en yüksek değer 692.18 fruktozda tespit edilmiştir. İnülin, sakaroz ve karragenan dışında diğer bileşenlerde HMF tespit edilememiştir. Yapılan analiz sonucunda başlangıçta HMF içermeyen saf standartların geleneksel HMF analiz metoduna maruz bırakıldığında ısı ve asit uygulamasından kaynaklı olarak HMF oluşumu gerçekleşmektedir. Sonuç olarak bağlı HMF' yi serbest hale geçirerek ölçüm yapma ilkesine dayanan geleneksel metotta aslında HMF serbest hale geçirelememektedir. Üstelik bu uygulamadan dolayı söz konusu bu başlıca bileşenlerin (karragenan, sakkaroz, inülin, fruktoz) bulunduğu gıdalarda HMF tespiti sırasında uygulanan ısı ve asit işlemleri sırasında gıdada mevcut HMF' ye ilave olarak söz konusu bileşenlerden kaynaklı oluşan HMF ortaya çıkmakta HMF miktarını etkilemektedir.

4.1.3. Protein-Şeker Kombinasyonlarında HMF Analiz Sonuçları

% 2 konsantrasyonunda hazırlanan fruktoz çözeltisine % 2, 1, 0.5 ve 0.25 oranlarında kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu ilave edilmiştir. Bir sonraki aşamada fruktoz-kazein, fruktoz-gluten ve fruktoz- peynir altı suyu tozundan oluşan protein-şeker kombinasyonlarında geleneksel HMF analizi uygulanarak HMF tespiti yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.3’ de gösterilmiştir.

Tüm kombinasyonlarda protein miktarı düştükçe HMF miktarında artış görülmüştür. %2 konsantrasyondaki fruktoz ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (% 2, 1, 0.5, 0.25) kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu çözeltilerinde HMF analizi sonuçlarına göre; % 2 fruktoz - % 0.25 kazein kombinasyonunda 3367.58 ppm değeri ile en fazla, % 2 fruktoz - % 2 peynir altı suyu tozu kombinasyonunda 316.50 ppm değeri ile en düşük HMF değeri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. % 2’ lik fruktoz çözeltisi ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (% 2, 1, 0.5, 0.25) kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu çözeltilerinde HMF analizi sonuçları

Konsantrasyon (%)	HMF (ppm)		
	Kazein	Gluten	Peynir Altı Suyu Tozu
2	379.06	358.03	316.50
1	795.363	766.73	708.09
0.50	1653.22	1585.93	1510.47
0.25	3367.58	3132.32	3224.73

% 2 konsantrasyonunda hazırlanan glukoz çözeltisine % 2, 1, 0.5 ve 0.25 oranlarında kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu ilave edilmiştir. Bir sonraki aşamada glukoz-kazein, glukoz-gluten ve glukoz- peynir altı suyu tozundan oluşan protein-şeker kombinasyonlarında geleneksel HMF analizi uygulanarak HMF tespiti yapılmıştır. İçeriğinde % 2 glukoz ve % 2 peynir altı suyu tozu bulunduran protein-şeker kombinasyonunda 3.36 ppm oranında HMF tespit edilmiştir fakat diğer protein-şeker modellerinde HMF tespit edilmemiştir. Analiz sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.4’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. % 2’ lik glukoz çözeltisi ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (% 2, 1, 0.5, 0.25) kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu çözeltilerinde HMF analizi sonuçları

Konsantrasyon	HMF (ppm)		
	Kazein*	Gluten	Peynir Altı Suyu

(%)	Tozu		
2	TE	TE	3.36
1	TE	TE	TE
0.50	TE	TE	TE
0.25	TE	TE	TE

*TE : tayin edilememiştir

% 2 konsantrasyonunda hazırlanan sakkaroz çözeltisine % 2, 1, 0.5 ve 0.25 oranlarında kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu ilave edilmiştir. Bir sonraki aşamada sakkaroz-kazein, sakkaroz-gluten ve sakkaroz- peynir altı suyu tozundan oluşan protein-şeker kombinasyonlarında geleneksel HMF analizi uygulanarak HMF tespiti yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.5’ de gösterilmiştir.

Tüm kombinasyonlarda protein miktarı düştükçe HMF miktarında artış görülmüştür. %2 konsantrasyondaki sakkaroz ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (% 2, 1, 0.5, 0.25) kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu çözeltilerinde HMF analizi sonuçlarına göre % 2 sakkaroz çözeltisi ile hazırlanan % 2 konsantrasyondaki kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu kombinasyonlarında en düşük HMF değerleri tespit edilmişken, % 0.25 konsantrasyonunda hazırlanan kombinasyonlarda en fazla HMF değerleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. % 2’ lik sakkaroz çözeltisi ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (% 2, 1, 0.5, 0.25) kazein, gluten ve peynir altı suyu tozu çözeltilerinde HMF analizi sonuçları

Konsantrasyon (%)	HMF (ppm)		
	Kazein	Gluten	Peynir Altı Suyu Tozu
2	151.57	211.67	182.78
1	357.25	460.83	427.54
0.50	814.37	899.52	916.42
0.25	1659.02	1932.16	1886.11

4.2. Bebek Maması Kimyasal Analiz Sonuçları

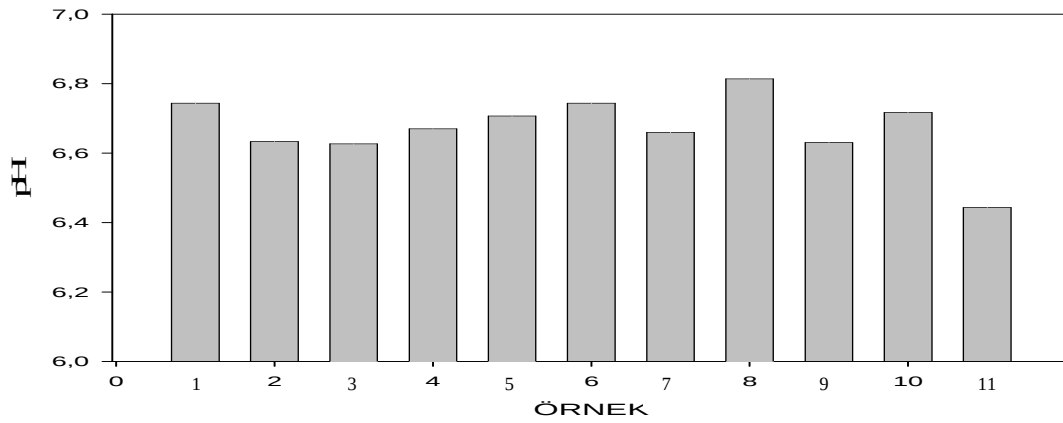
4.2.1. pH Tayini Sonuçları

Bebek maması örneklerinin ortalama pH değerleri Çizelge 4.6’ da ve söz konusu değerlerin grafiksel olarak gösterimi ise Şekil 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Bebek maması örneklerinin ortalama pH değerleri

Örnek No	pH
1	6.74
2	6.63
3	6.62
4	6.67
5	6.70
6	6.74
7	6.66
8	6.81
9	6.63
10	6.71
11	6.44
Ortalama	6.67

Bebek maması örnekleri içerisinde 11 numaralı örnek 6.44 değeri ile en düşük, 8 numaralı örnek ise 6.81 değeri ile en yüksek değerdedir. Tespit edilen pH değerleri diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Chavez-Servin ve ark., 2006; Ferrer ve ark., 2002; McSweeney ve ark., 2004).



Şekil 4.1. Bebek maması örneklerinin pH değerleri

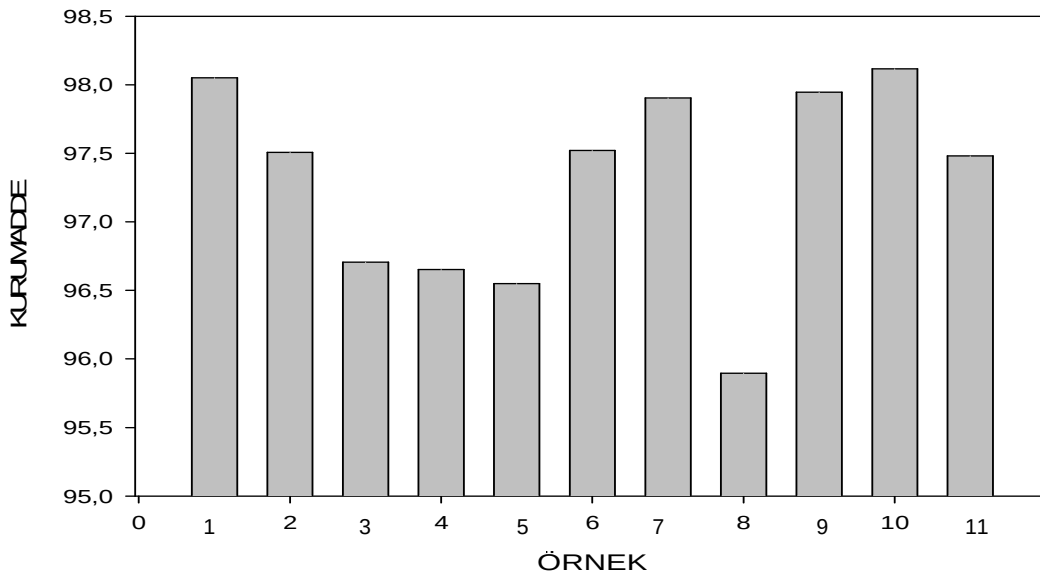
4.2.2. Kuru Madde Tayini Sonuçları

Bebek maması örneklerinin ortalama % kuru madde değerleri Çizelge 4.7' de ve söz konusu değerlerin grafiksel olarak gösterimi ise Şekil 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Bebek maması örneklerinin ortalama % kuru madde değerleri

Örnek No	Kurumadde (%)
1	98.05
2	97.50
3	96.70
4	96.65
5	96.55
6	97.52
7	97.90
8	95.89
9	97.94
10	98.11
11	97.48
Ortalama	97.30

Bebek maması örnekleri içerisinde 11 numaralı örnek 6.44 değeri ile en düşük, 8 numaralı örnek ise 6.81 değeri ile en yüksek değerdedir.



Şekil 4.2. Bebek maması örneklerinin % kuru madde değerleri

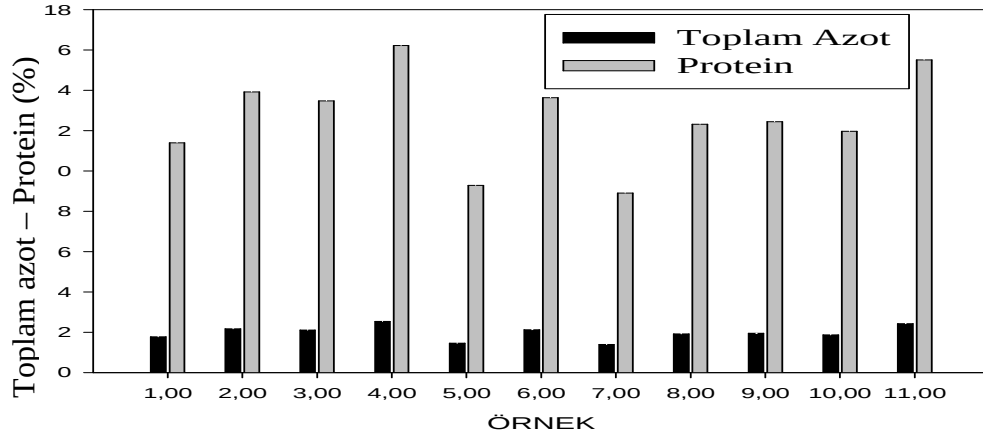
4.2.3. Protein Tayini Sonuçları

Bebek maması örneklerinin ortalama % toplam azot ve % protein değerleri Çizelge 4.8' de ve grafiksel olarak gösterimi ise Şekil 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bebek maması örneklerinin ortalama % toplam azot ve % protein değerleri

Örnek No	Toplam Azot (%)	Protein (%)
1	1.78	11.39
2	2.18	13.92
3	2.11	13.48
4	2.54	16.22
5	1.45	9.29
6	2.13	13.63
7	1.39	8.91
8	1.93	12.31
9	1.95	12.44
10	1.87	11.97
11	2.43	15.50
Ortalama	1.98	12.64

Bebek maması örnekleri içerisinde 7 numaralı örnek 1.39 (%) toplam azot ve 8.91 (%) protein değeri ile en düşük, 4 numaralı örnek ise 2.54 ve 16.22 değeri ile en yüksek değerdedir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Bebek Mamaları – Bebek Formülleri Tebliği'nde (EK-A) belirtilen değerlere uygun olmakla beraber diğer çalışmalarla da paraleldir (Guerra-Hernandez ve ark., 2002a; Guerra-Hernandez ve ark., 2002b; Ferrer ve ark., 2002; Chavez ve Servin ve ark., 2005).



Şekil 4.3. Bebek maması örneklerinin % toplam azot ve protein değerleri

4.2.4. Şeker Analizi Sonuçları

Bebek maması örneklerindeki mevcut şeker çeşitleri ve ortalama % miktarları Çizelge 4.9’ da ve toplam % şeker miktarları ise Çizelge 4.10’ da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Bebek maması örneklerindeki şeker çeşitleri ve % miktarları

Örnek No	Fruktoz* (%)	Laktoz (%)	Glukoz (%)	Sakkaroz (%)
1	5.10	22.80	TE	17.89
2	6.04	16.11	20.45	TE
3	TE	20.48	TE	15.82
4	TE	TE	TE	17.40
5	TE	TE	TE	34.50
6	7.43	35.03	4.45	TE
7	TE	TE	26.37	12.43
8	TE	TE	38.29	10.51
9	TE	TE	TE	TE
10	3.23	13.57	21.40	TE
11	0.60	4.57	TE	5.13

*TE : tayin edilememiştir

Çizelge 4.10. Bebek maması örneklerinin toplam şeker miktarları (%)

Örnek No	Toplam Şeker (%)*
1	45.84
2	42.61

3	33.30
4	17.44
5	34.59
6	46.92
7	38.83
8	48.80
9	TE
10	38.28
11	10.31

*TE : tayin edilememiştir

Bebek maması örnekleri içerisinde 3, 4, 5, 7, 8, ve 9 numaralı örneklerde fruktoz tespit edilememişken, 6 numaralı örnek % 7.43 değeri ile en yüksek, 11 numaralı örnek % 0.06 değeri ile en düşük fruktoz değerlerine sahiptir. Bebek mamalarından 4, 5, 7, 8 ve 9 numaralı örnekler laktoz içermemektedir. İçeriğinde laktoz bulunan örneklerden 6 numaralı örnek % 35.03 değeri ile en yüksek laktoz miktarına sahipken % 4.57 değeri ile 11 numaralı en düşük laktoz değerine sahiptir. Bebek mamaları örneklerinden 1, 3, 4, 5, 9 ve 11 numaralı örneklerde glukoz bulunmamaktadır. 8 numaralı örnek % 38.29 değeri ile en yüksek, 6 numaralı örnek % 4.45 değeri ile en düşük değere sahiptir. Bebek maması örneklerinden 2, 6, 9 ve 10 numaralı örneklerde sakkaroz tespit edilememiştir. İçeriğinde sakkaroz bulunan örneklerden 5 numaralı örnek % 34.50 değer ile en yüksek sakkaroz değerine sahip iken 11 numaralı örnekte % 5.13 oranında en düşük sakkaroz miktarı bulunmaktadır. Şeker miktarı toplam olarak değerlendirildiğinde 9 numaralı örnekte şeker bulunmamasına karşın 8 numaralı örnekte toplam % 48.8 oranında şeker bulunmaktadır.

Sonuçlar Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Bebek Mamaları – Bebek Formülleri Tebliği' nde (EK- A) belirtilen değerlere uygundur. Ayrıca diğer araştırmacılar (Chavez-Servin ve ark., 2004; Chavez ve ark., 2006b) tarafından farklı bebek mamalarında tespit edilen değerler ile uyumluluk göstermektedir.

Tespit edilen sonuçlar içeriğinde laktoz yerine fruktoz kullanılan bebek mamalarında HMF miktarının arttığını ileri süren çalışmaları (Evangelisti ve ark., 1994; Albala-Hurtado ve ark., 1999) desteklemektedir.

4.2.5. HMF Analizi Sonuçları

4.2.5.1. Geleneksel HMF Analizi Sonuçları

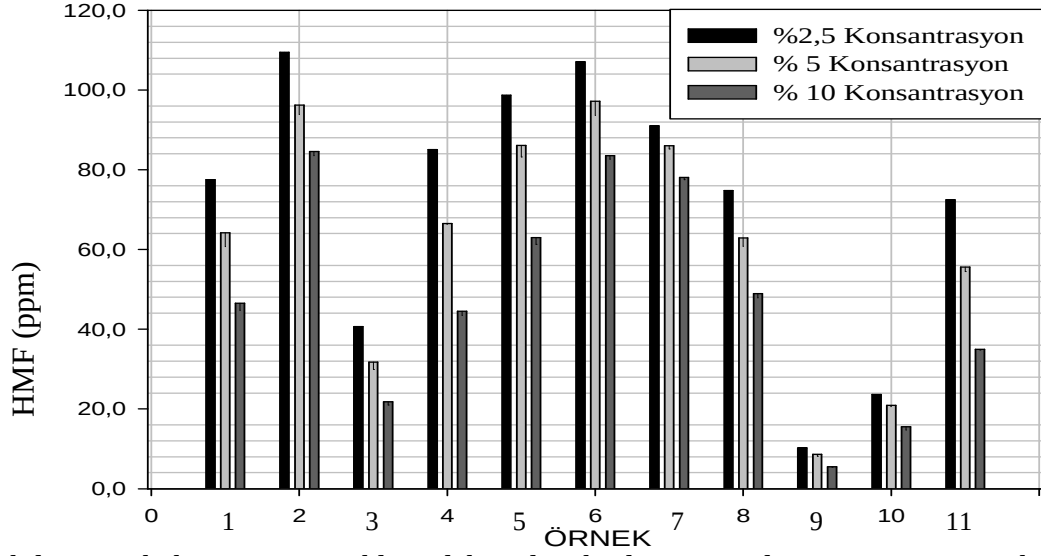
% 2.5 konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine uygulanan geleneksel HMF analiz metodu sonucunda 9 numaralı örnek 10.26 değeri ile en düşük, 2 ve 6 numaralı

örnekler ise 109.48 ve 107.08 değeri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir. % 5 konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine uygulanan geleneksel HMF analiz metodu sonucunda 9 numaralı örnek 8.57 değeri ile en düşük, 2 ve 6 numaralı örnekler ise 96.21 ve 97.21 değeri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir. % 10 konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine uygulanan geleneksel HMF analiz metodu sonucunda 9 numaralı örnek 5.51 değeri ile en düşük, 2 ve 6 numaralı örnekler ise 84.57 ve 83.59 değeri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Geleneksel HMF analizine göre bebek maması örneklerindeki ortalama HMF değerleri

Örnek No	HMF miktarları (ppm)		
	Konsantrasyon		
	% 2.5	% 5	% 10
1	77.56	64.18	46.56
2	109.48	96.21	84.57
3	40.70	31.72	21.84
4	85.07	66.54	44.52
5	98.71	86.07	62.94
6	107.08	97.21	83.59
7	91.00	86.03	78.12
8	74.77	62.91	48.97
9	10.26	8.57	5.51
10	23.66	20.93	15.55
11	72.49	55.64	34.98
Ortalama	71.88	61.45	47.92

Bebek maması örneklerinde geleneksel HMF analizi sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Bebek maması örneklerindeki geleneksel HMF analizine göre HMF miktarları

4.2.5.2. Modifiye HMF Analizi Sonuçları

Bebek mamalarından hazırlanan % 2.5 konsantrasyondaki (w/v) örnekler üzerine uygulanan modifiye HMF analiz metodu sonucunda 1 ve 9 numaralı örneklerde HMF tespit edilememişken, 2 ve 6 numaralı örnekler ise 91.86 ve 72.94 değerleri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir. % 5 konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine uygulanan geleneksel HMF analiz metodu sonucunda 1 ve 9 numaralı örneklerde HMF tespit edilememişken, 2 ve 6 numaralı örnekler ise 43.99 ve 35.22 değerleri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir. % 10 konsantrasyonda hazırlanan bebek maması örneklerine uygulanan geleneksel HMF analiz metodu sonucunda 1 ve 9 numaralı örneklerde HMF tespit edilememişken, 2 ve 6 numaralı örnekler ise 22.89 ve 18.15 değeri ile en yüksek HMF miktarlarına sahiptir.

Bebek maması örneklerinde modifiye HMF analizi sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.12’ de gösterilmiştir.

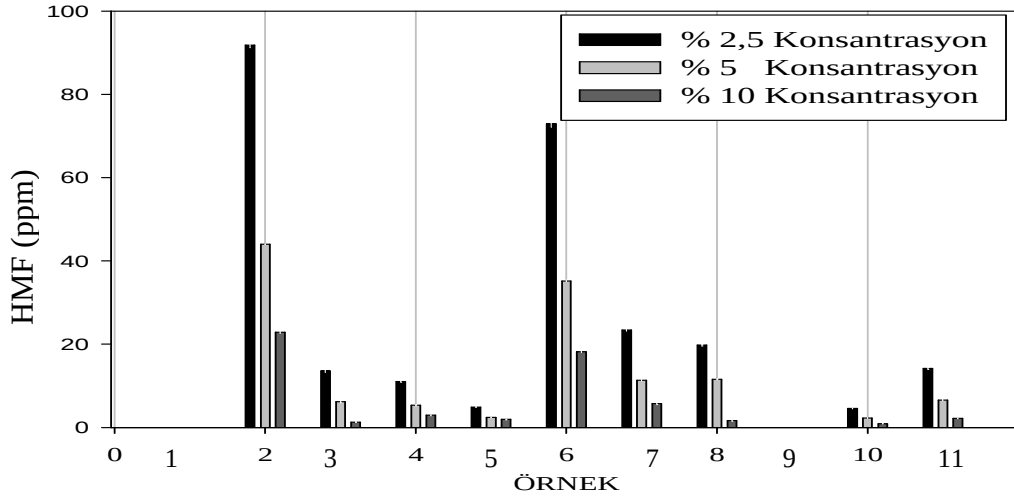
Çizelge 4.12. Modifiye HMF analizine göre bebek maması örneklerindeki ortalama HMF değerleri

Örnek No	HMF miktarları (ppm)*		
	Konsantrasyon		
	% 2.5	% 5	% 10
1	TE	TE	TE
2	91.86	43.99	22.89
3	13.60	6.16	1.31

4	11.07	5.37	2.94
5	4.92	2.43	1.92
6	72.94	35.22	18.15
7	23.43	11.37	5.77
8	19.76	11.59	1.67
9	TE	TE	TE
10	4.61	2.27	0.90
11	14.20	6.62	2.22
Ortalama	23.36	11.36	5.25

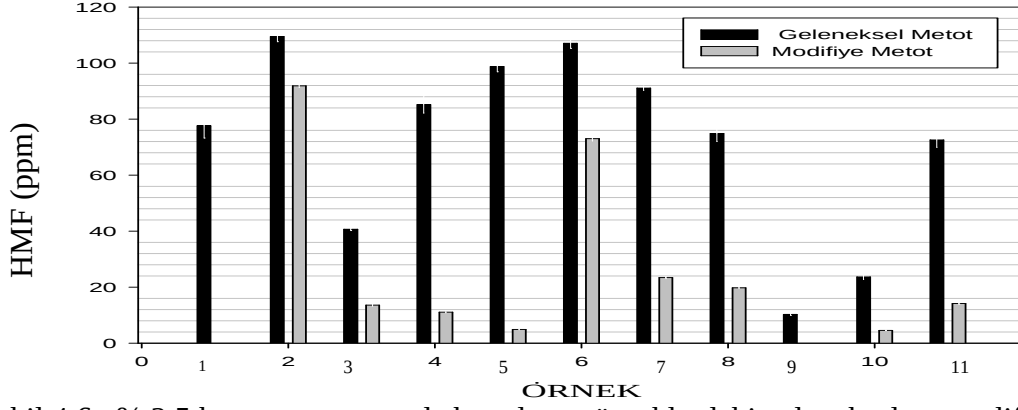
*TE : tayin edilememiştir

Bebek maması örneklerinde modifiye HMF analizi sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.5' de gösterilmiştir.

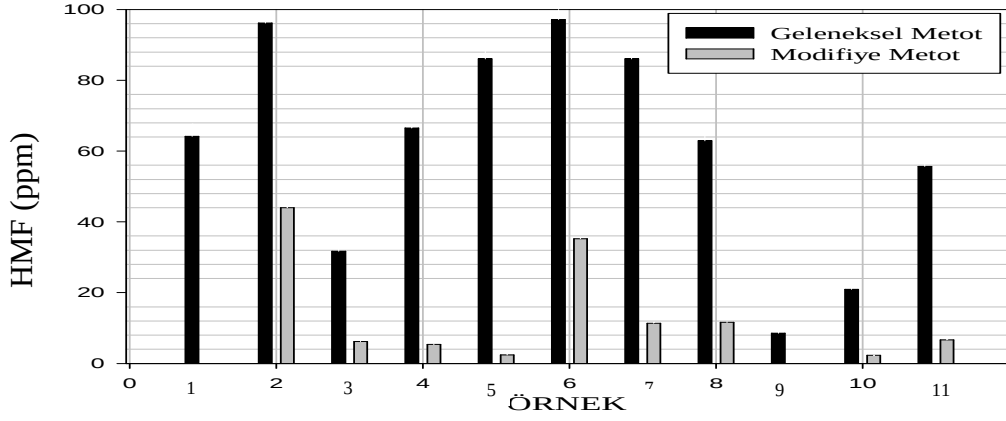


Şekil 4.5. Bebek maması örneklerindeki modifiye HMF analizine göre HMF miktarları

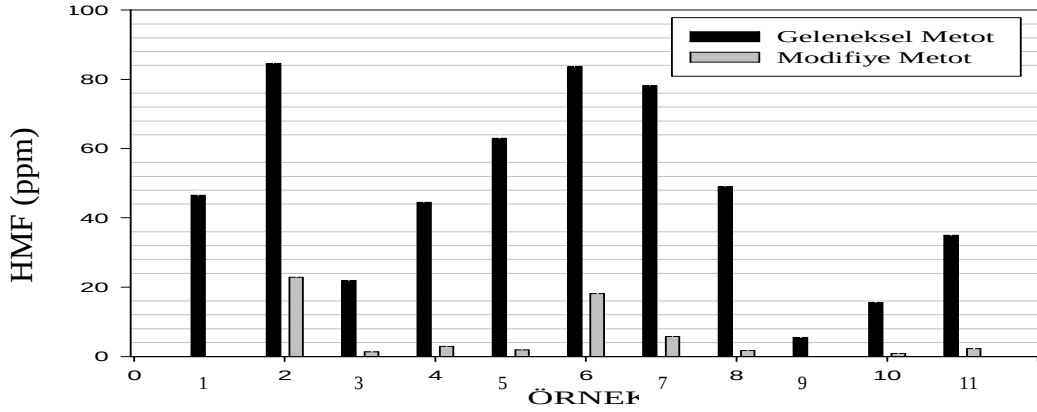
Geleneksel ve modifiye HMF metotlarında elde edilen sonuçların karşılaştırılması % 2.5 konsantrasyonunda hazırlanan örnekler için Şekil 4.6' da, % 5 konsantrasyonunda hazırlanan örnekler için Şekil 4.7' de, % 10 konsantrasyonunda hazırlanan örnekler için Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.6. % 2.5 konsantrasyonunda hazırlanan örneklerdeki geleneksel ve modifiye metot uygulanması sonucu tespit edilen HMF miktarları



Şekil 4.7. % 5 konsantrasyonunda hazırlanan örneklerdeki geleneksel ve modifiye metot uygulanması sonucu tespit edilen HMF miktarları



Şekil 4.8. % 10 konsantrasyonunda hazırlanan örneklerdeki geleneksel ve modifiye metot uygulanması sonucu tespit edilen HMF miktarları

5. SONUÇ

Toz gıdaların bünyesinde bulunan bileşenlerin değişik konsantrasyonlarında hazırlanan standartlarına uygulanan geleneksel metotta HMF oluşumları incelenmiştir. Bu bileşenler içerisinde şekerlerden başta fruktoz olmak üzere sakaroz, kıvam vericilerden karragenan ve diğer bileşenlerden ise inülin varlığında yüksek düzeyde HMF oluşumu meydana gelmektedir. Söz konusu geleneksel metotta ısı ve asit uygulamaları nedeniyle bileşenlerden gelen bir miktar HMF ise gıdanın içinde mevcut HMF olarak değerlendirilmiş ve toplam HMF olarak ifade edilmiştir. Yüksek miktarda tespit edilen HMF ise başta toz bebek maması olmak üzere ısıtıl işlem uygulanmış toz gıdaların bünyesinde mevcut HMF ‘nin sağlıklı bir şekilde tespit edilememesine neden olmaktadır.

Literatürde serbest HMF ve protein fraksiyonlarına bağlı olan HMF toplam HMF olarak ifade edilmiştir. Toplam HMF ‘nin tespiti için ısı ve asit uygulamasının proteine bağlı olan HMF ‘yi serbest hale geçirmesi gerekliliği ifade edilmektedir. Ancak yapılan bu çalışmada ısı ve asit uygulamasının bağlı HMF ‘yi serbest hale geçirmediği HMF ‘nin proteine sadece ortalama % 10 oranında bağlandığı tespit edilmiştir.

HMF’ nin proteine bağlanma durumu değerlendirildiğinde HMF kazeine bağlanmış ancak glutene bağlanmamıştır. Bağlanan protein üzerinde ise uygulanan ısı ve asit işlemlerinin HMF ‘nin serbest hale geçmesini sağlamadığını ortaya koymaktadır.

Fruktoz, sakaroz ve glukozdan hazırlanan belli konsantrasyonlardaki şeker çözeltilerinde belirli oranda proteinler (kazein, gluten ve peyniraltı suyu tozu) ilave edilmiştir. Bu kombinasyonlardan fruktoz ve sakkarozlu protein fraksiyonlarda uygulanan geleneksel metot sonucunda HMF tespit edilmiştir. Bu çözeltilerde % protein miktarı düştükçe HMF miktarında artışın olması geleneksel metotta kullanılan ısı ve asit uygulaması sonucunda

oluşan HMF ‘nin bağlandığı protein miktarının düşmesinden dolayıdır. Bu durum ise HMF ‘nin proteine belirli bir oranda bağlandığı ve ayrılmadığını desteklemektedir.

Bebek mamaları da dahil olmak üzere toz gıdalarda HMF tespitinde kullanılan geleneksel metotta örnek hazırlama sürecinde 25 dakika süren kaynar su banyosu uygulaması yer almaktadır. Bu uygulama HMF analizi için örneklerin analize hazırlanmasında süre yönünden bir dezavantajdır. Modifiye metotta ise örnek hazırlamasında kaynar su banyosunda bekleme süresi olmadığından daha hızlı bir analiz süresi sağlanmış olmaktadır.

Geleneksel metotta örnek hazırlama sürecinde analiz edilecek her bir örnek için 3 mL % 40’ lık TCA çözeltisi ve 5 mL 0.3 N okzalik asit gibi sarf maddeleri kullanılmaktadır. Modifiye metotta ise asit hidrolizine gerek kalmadığı için sadece çöktürme aşamasında 0.1 mL Carez I ve 0.1 mL Carez II kullanılmıştır. Her iki metot karşılaştırıldığında harcanan sarf malzemeleri açısından modifiye metot daha avantajlı bir konumda bulunmaktadır.

Bebek mamalarına uygulanan geleneksel metot ile tespit edilen HMF miktarları modifiye metot ile tespit edilen miktarlara göre daha yüksek değerdedir. Bu durum örneklerle uygulanan ısı ve asit işlemlerinin HMF değerlerini daha yüksek miktarda tespit edilmesine neden olduğunu göstermektedir. HMF tespiti için hazırlanan çözeltilerin % olarak değerleri düştükçe tespit edilen HMF miktarı artmıştır.

Her iki metotta da en yüksek HMF değerlerine sahip olan 2 ve 6 numaralı örnekler toplam şeker miktarına göre en yüksek değerlere sahip olmamalarına karşın en yüksek fruktoz miktarına sahip ilk iki örnektir. Ayrıca toplam şeker miktarı tespit edilemeyen 9 numaralı örnekte geleneksel HMF metodu uygulandığında HMF tespit edilmişken, modifiye metot ile yapılan analizde HMF miktarı tespit edilememiştir. Bu durum modifiye metotun şeker miktarları ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Fruktoz miktarı yüksek olan örneklerde geleneksel metod ile tespit edilen HMF miktarı diğer örneklerle göre daha yüksek değerlerde tespit edilmiştir. Bu durum ise fruktoz miktarı yüksek olan toz gıdalarda yöntemden kaynaklı HMF miktarındaki artışın daha fazla olduğunu göstermektedir. Şeker miktarı tespit edilemeyen örnekte geleneksel metotta belirli miktarı da HMF tespit edilmişken modifiye metot ile HMF tespit edilmemiştir. Bu durum ise modifiye metotun daha sağlıklı bir metot olduğunun göstergesidir.

Geleneksel HMF metodu farklı modeller oluşturularak incelenmeli ve alternatif yöntemler ortaya konulmalıdır. Ortaya konulacak alternatif yöntemlerin tutarlılıkları ise değişik örnekler kullanılarak kanıtlanmalıdır. Böylece toz gıdalarda mevcut HMF doğru bir şekilde tespit edilebilir.

6.KAYNAKLAR

- Agostini, C., Marangoni, F., GAmboni, A., Bernardo, L., Lammardo, A.M., Riva, E., 1999. Acta Paediatr. Suppl. 430, 68.
- Albala-Hurtado, S., Veciana-Nogus, T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 1997. Determination of free and total furfural compounds in infant milk formulas by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (6), 2128-2133.
- Albala-Hurtado, S., Veciana-Nogus, T., Marin-Font, A., Vidal-Carou, M. C. 1998. Changes in furfural compounds during storage of infant milks. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2998-3003.
- Albala-Hurtado, S., Veciana-Nogus, T., Marin-Font, A., Vidal-Carou, M.C, 1999. Progress of browning reactions during storage of liquid infant milks. Journal of Agriculture of Food Chemistry, 47 (10), 4033-4037.
- Antal, M.J., Mok, W.S.L., Richards, G.N., 1990. Mechanism of formation of 5(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from -fructose and sucrose. Carbohydrate Research, 199(1), 91-109
- Archer, M. C., Bruce, W. R., Chan, C. C., Corpet, D. E., Medline, A., Roncucci, L., Stamp, D., Zhang, X-M., 1992. Aberrant crypt foci and microadenoma as markers for colon cancer. Environ. Health Perspect., 98, 195-197.
- Berg, H.E., Boekel, M.A.J.S., 1994. Neth. Milk Dairy J. 48, 157.
- Block, J.D., Merchiers, M., Mortier, L., Braekman, A., Ooghe, W., Renterghem, R.V., 2003. Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis

- of the whey protein fraction compared with other methods. *International Dairy Journal*, 13, 87-94.
- Bruce, W.R., Archer, M.C., Corpet, D.E., Medline, A., Minkin, S., Stamp, D., Yin, Y., Zhang, X.M., 1993. *Mutat. Res.* 290, 111.
- Burton, H., 1984. Reviews of the progress of dairy science: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150 °C. *Journal of Dairy Research* 51, 341-463.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 328s, Ankara.
- Cemeroğlu, B., 2007, *Gıda analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34.* Ankara
- Chavez-Servin, J.L., Castellote, A.I., Lopez-Sabater, M.C., 2005. Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high performance liquid chromatography evolution during storage, *Journal of Chromatography A*, 1076 , 133-140.
- Chavez-Servin, J.L., Castellote, A.I., Lopez-Sabater, M.C., 2006. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Research International*, 39, 536-543.
- Ciolino, L.A., 1988. Determination and classification of added caramel color in adulterated acerola juice formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1746-1753.
- Clarke, M.A., Edye, L.A., Eggleston, G., 1997. Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 52, 441-470.
- Danehy, J.P., 1986. Maillard reaction: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. *Advances in food research.* In Academic Press Inc.
- Dijkstra, L., Walker, R.L., 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*) *Journal of the Science of Food Agriculture*, 54, 229-234.
- Eichner, K., Ciner-Doruk, M., 1981. Early indication of the Maillard reaction by analysis of reaction intermediates and volatile decomposition products. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 115-135.
- Eggleston, G., Trask-Morrel, B., Vercellotti, J.R., 1996. Use of differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis to characterize the thermal

- degradation of crystalline sucrose and dried sucrose-salt residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3319–3325.
- Eggleston, G., Vercellotti, J.R., 2000. Degradation of sucrose, glucose and fructose in concentrated aqueous solutions under constant pH conditions at elevated temperature. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 19(9), 1305–1318.
- Ekici, L., 2005. Farklı Polimer Filmlerde Ambalajlanan Üzüm Suyu Konsantresinde HMF Olusumu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Eskin, N.A.M., 1990. *Biochemistry of foods*. (2nd ed.) California: Academic Press. Inc.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Gomes, A.M.P., Ferreira, M.A., 1998. *Carbonhydr. Polym.* 27,225.
- Ferrer, E., Alegria, A., Farre, R., Abellan, P., Romero, F., 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas. Change during heat treatment and storage. *Journal of Chromatography A*, 947, 1, 85-95.
- Ferrer, E., Alegria, A., Farre, R., Abellan, P., Romero, F., 2005. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas during full shelf life. *Food Chemistry*, 89, 639-645.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R. F., Liardon, R., 1990. The maillard reaction in food processing. *Human nutrition and physiology*. 39, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Fujimaki, M., Namiki, M., Kato, H., 1986. *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*. Elsevier, Amsterdam.
- Fujita, S., Tano, T., Kawahara, H., 1991. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 55, 643-651.
- Glatt, H., Schneider, H., Liu, Y., 2005. V79-hCYP2E1-hSult1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effect induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. *Mutation Research*, 580, 41-52.

- Gottschalk, A., 1952. Some biochemically relevant properties of N-substituted fructosamines derived from amino acids and N-arylglucosylamines. *Biochemical Journal*, 52, 455.
- Guesry, P., 1998. The role of nutrition in brain development. *Preventive Medicine*, 27,2, 189.
- Guerra-Hernandez, E., Garcia-Villanova, B., Montilla-Gomez, J., 1992. Determination of hydroxymethylfurfural in baby cereals by high performance liquid chromatography. *Journal Liquid Chromatography and Related Technology*, 15(14), 2551-2559.
- Guerra-Hernandez, E., Leon, C., Corzo, N., Garcia-Villanova, B., Romera, J. M. , 2002a. Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 55-(4), 171-176,
- Guerra-Hernandez, E., Leon, C., Garcia-Villanova, B., Sanchez, N. C., Gomez, J. M. R., 2002b. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 587-592.
- Handwerk, R.L., Coleman, R.L., 1998. Approaches to the citrus browning problem. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 36, 231-236.
- Hodge, J.E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agriculture and food Chemistry*, 1, 928-943.
- Hodge, J. E., 1967. Nonenzymatic browning reactions. In *symposium on foods: The chemistry and physiology of flavors*. Schultz, H. W., Day E. A., Libbey L.M., .AVIPublishing Co. Westport, Conn., 465-491.
- Hodge, J.E., Mills, F.D., Fisher, B.E., 1972. Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reactions. *American association of cereal Chemists*, 17, 34- 40.
- Iglesia, F., Lbaro, F., Puchades, R., Maquieira, A., 1997. Automatic determination of 5 hydroxymethylfurfural (5-HMF) by a flow injection method. *Food Chemistry*, 60, 2, 245-250.
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G., 2000. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA- damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 801- 809.
- Jeffrey, B.G., Weisinger, H.S., Neuringer, M., Mitchell, D.C., 2001. *Lipids*, 36, 859. Jun, M., Shao, Y., Ho, C.T., Koether, U., Lech, S., 2003. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6340.

- Keleş, F., Kökosmanlı, M., 1996. Kusburnu ve kusburnu çayında C vitamini.Kusburnu Sempozyumu (Bildiriler Kitabı), 5-6 Eylül 1996, 245-252, Gümüşhane.
- Kockel, T.K., Allen, S., Hennigs, C., Langrish, T.A.G., 2002. An experimental study of the equilibrium for skim milk powder at elevated temperatures. *Journal of Food Engineering* 51, 4, 291.
- Kolpe, U., Ramaswamy, V., Satish Rao, B.S., Nagabhushan, M., 2002. Turmeric and curcumin prevents the formation of mutagenic Maillard reaction product *International Congress Series* 1245, 327– 334
- Kroh, L.W., 1994. Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51(4), 373–379.
- Labuza, T.P., Reineccius, G.A., Monnier, V.M., O'Brien, J., Baynes, J.W., 1994. Maillard reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Lee, F.A., 1983. *Basic Food Chemistry*, second edition, The Avi Publishing Company, Inc., U.S.A, 564.
- Lee, P.M., Lee, K., Karim, M.I.A., 1991.Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *Journal of the Science Food Agriculture*, 55, 251-260.
- Lee, Y.C., Shlyankevich, M., Jeong, H.K., Douglas, J.S., Surh, Y.J. 1995. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 996.
- Lee, S.K., Kader, A.A., 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Le Maguer, M., Jelen, P., 1986. *Food Engineering and Process Applications*, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 141-149.
- Leloir, L.F., Cardini, C.E., 1953. *Biochim. Biophys Acta* 12, 15. Le Maguer, M. and Jelen, P., 1986. *Food engineering and process applications* (Vol. 1, pp. 313- 321). London and New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Lewkowski, J., 2001.Synthesis, chemistry and application of 5-Hydroxymethyl-furfural and its derivatives. University of Lodz, Department of Organic Chemistry. SSN 1424-6376, 17-54,
- Lo Coco, F., Ceccon, L., Valentini, C., Novelli, V., 1992. *Journal of Chromatography*. 590, 235.
- Lowary, T.L., Richards, G.N., 1988. Effects of impurities on hydrolysis of sucrose in concentrated aqueous solutions. *International Sugar Journal*, 90(1077), 164–167.

- Mauch, W., 1971. Chemical properties of sucrose. *Sugar Technology Reviews*, 1, 239– 290.
- Mendoza, M.R., Olano, A., Villamiel, M., 2002. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit based foods. *Food Chemistry*, 79, 513-516,
- Miller, J.A., 1994. Recent studies on the metabolic activation of chemical carcinogens. *Cancer Research (Suppl.)* 54, 1879-1881.
- Morales, F.J., Romero, C., Jimenez-Perez, S., 1992. An enhanced liquid chromatographic method for 5-hydroxymethylfurfural determination in UHT milk. *Chromatographia* 33, 45. Naessberger, L. *Hum. Exp. Toxicol.* 9 (1990) 211.
- Naessberger, L., Sjöholm, A.G., Jonsson, H., 1990. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin. Exp. Dermatol.*, 81, 380-383.
- Namiki, M., 1988. Chemistry of Maillard reactions: Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Advances in Food Research*, In Academic Press. Inc.
- Özkan, N., Withy, B., Dong Chen, X., 2003. Effects of time, temperature, and pressure on the cake formation of milk powders. *Journal of Food Engineering*, 58, 4, 355.
- Xiang, M., Zetterstrom, R., 1999. Relation between polyunsaturated fatty acids and growth. *Acta Paediatr.*, 430, 88, 78-82.
- Quintas, M.A.C., Brando, T.R.S., Silva, C.L.M., 2007. Modelling colour changes during the caramelisation reaction. *Journal of Food Engineering*, 83, 483-491.
- O'Brien, J., Morrissey, P.A., 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 211-235.
- Ponting, J.D., Bean, R.S., Notter, G.K., Makower, B., 1954. Degree of heat inactivation of polyphenol oxidase and quality of frozen apricot puree. *Food Technology*, 8, 573-575.
- Rada-Mendoza, M., Olano, A., Villamiel, M., 2002. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 79, 513-516.
- Roig, M.G., Bello, J.F., Rivera, Z.S., Kennedy, J.F., 1999. Studies on the occurrence of nonenzymatic browning during storage of citrus juices. *Food Research International*, 32, 609-619.

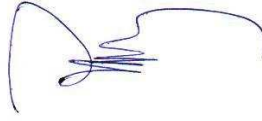
- Richards, G.N., 1986. Initial steps in thermal degradation of sucrose. *International Sugar Journal*, 88(1052), 145–148.
- Rojas, A.M. and Gerschenson, L.N., 2001. Ascorbic Acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1443-1439.
- Sıddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., 1992.Characterization of polyphenoloxidase from Stanley Plums. *Journal of Food Science*, 57, 1177-1179.
- Surh, Y.J., Liem, A., Miller, J.A., Tannenbaum,S.R., 1994. Carcinogenesis 15, 2375.
- Surh, Y.J., Tannenbaum, S.R., 1994. Activation of the Maillard Reaction product 5-(Hydroxymethyl) furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chemical Research Toxicology*, 7 (3), 313-318.
- Tate, J.N., Luh, B.S., Yort, G.K., 1964. Polyphenol oxidase in bartlett pears. *Journal of Food Science*, 29, 829-836,
- Tomlinson, A.J., Landers, J.P., Lewis I.A.S., Naylor, S.,1993. *Journal ofCromatography A*, 652, 171.
- Vamos-Viglazo. L., Mihalyi, K., 1976. Review of the international literature on diphenol oxidases of peach fruits. *Confructa.*, 21, 234-241.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci.*, 15, 49-127.
- Valero, E., Varon, R., Garcia-Carmano, F., 1988. Characterization of polyphenol oxidase from airen grapes. *Journal of Food Science*, 53, 1482-1485.
- Waller, G. R., Feather, M. S., 1983. The maillard reaction in foods and nutrition. *American Chemical Society, Washington, D.C.*
- Williams, D.C., Lim, M.H., Chen, A.O., Pangborn, R.M., Whitaker, J.R., 1986. Blanching of vegetables for freezing-which indicator enzyme to choose. *Food Technology*, 6, 130-140.
- Xiang, M., Zetterstrom, R., 1999. Relation between polyunsaturated fatty acids andgrowth. *Acta Paediatr.*,430, 88, 78-82.
- Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B., 1998. Hale haven şeftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri. *Tr. Journal of Agriculture and Forestry©TÜBITAK*, 22, 261-265.
- Zhang, X.M., Chan, C.C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M.C., Bruce, W.R., 1993. *Carcinogenesis* 14, 773.

Zhou, H., Feng, X., 1991. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). Journal of the Science Food and Agriculture, 57, 307-313.

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 26/08/2010 tarihinde yapılan sınav ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Bekir BATI



Üye: Prof. Dr. Fehmi YAZICI



Üye: Doç. Dr. Muhammet DERVİŞOĞLU



ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü