

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK KAHVESİNİN AKRİLAMİD İÇERİĞİ İLE ASPARAGİNAZ
ENZİMİNİN AKRİLAMİD OLUŞUMU VE UÇUCU BİLEŞİKLER
PROFİLİNE ETKİLERİ

Banu AKGÜN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Muhammet ARICI

EKİM, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRK KAHVESİNİN AKRİLAMİD İÇERİĞİ İLE ASPARAGİNAZ
ENZİMİNİN AKRİLAMİD OLUŞUMU VE UÇUCU BİLEŞİKLER
PROFİLİNE ETKİLERİ**

Banu AKGÜN tarafından hazırlanan tez çalışması 30.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammet ARICI

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

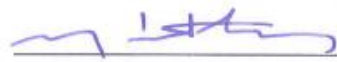
Prof. Dr. Muhammet ARICI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARADAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Doç. Dr. Salih KARASU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi



Danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Türk Kahvesinin Akrilamid İçeriği ile Asparaginaz Enziminin Akrilamid Oluşumu ve Uçucu Bileşikler Profiline Etkileri” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Banu AKGÜN

İmza

Bu alışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM/HSGYAD/A/18/A3/P1/174 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

biricik eşime

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince beni yönlendiren ve benden desteğini esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya,

Doktora eğitimim boyunca verdikleri desteklerden dolayı Enstitü Müdürümüz Yıldırım İSTANBULLU ve Katkı Kalıntı Bölüm Başkanımız Hakan TOSUNOĞLU'na,

Tez çalışmamda değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ömer Said TOKER'e,

Kurumdaki çalışmalarım süresince yardımlarını benden esirgemeyen Gıda Yüksek Mühendisi Ayşe Binnur KARATAŞ'a, Kimya Yüksek Mühendisi Filiz ÇAVUŞ'a, Dr. Huriye Özgül UÇURUM'a ve Gıda Yüksek Mühendisi Hacer EKŞİ KARAAĞAÇ'a,

Doktora eğitimim süresince gerek teknik, gerek manevi açıdan bana destek olan Tarım ve Orman Bakanlığı Bursa Gıda ve Yem Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğündeki tüm personele,

Tez projeme maddi destekte bulunan Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)'ne,

Doktora eğitimim süresince manevi desteğini benden esirgemeyen değerli eşim Dr. Zühtü Bener AKGÜN'e

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini hissettiğim canım annem Aysel DEDE'ye, canım babam İsmail Hakkı DEDE'ye ve kardeşlerim Binnaz DEDE ve Dr. Güner DEDE'ye çok teşekkür ederim.

Banu AKGÜN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii

1 Giriş

1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Akrilamid.....	1
1.1.2 Akrilamid Oluşum Mekanizmaları.....	3
1.1.2.1 Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşumu.....	3
1.1.2.2 Alternatif Yollar Üzerinden Akrilamid Oluşumu.....	4
1.1.3 Akrilamidin Sağlık Üzerine Etkileri.....	5
1.1.3.1 Nörotoksik Etkileri.....	6
1.1.3.2 Kanserojenik ve Genotoksik Etkileri.....	7
1.1.3.3 Üreme ve Gelişim Sistemi Üzerine Toksik Etkileri.....	8
1.1.4 Akrilamid Toksisitesinin Mekanizması.....	8
1.1.5 Akrilamidin Oluştığı Gıdalar.....	9
1.1.5.1 Kahve ve Kahve İkamesi.....	10
1.1.5.2 Patates.....	14
1.1.5.3 Tahıl Ürünleri.....	15
1.1.5.4 Kurutulmuş Meyveler ve Yenilebilir Tohumlar.....	16
1.1.6 Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	17
1.1.6.1 İndirgen Şekerler.....	17
1.1.6.2 Amino Asitler.....	19
1.1.6.3 Protein veya Karbonhidrat Yönünden Zengin Gıdalar.....	20

1.1.6.4 Yağlar.....	21
1.1.6.5 Gıdanın pH'ı.....	22
1.1.6.6 Gıdanın Nemi.....	22
1.1.6.7 Agronomik Faktörler.....	22
1.1.7 Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Azaltma Stratejileri.....	23
1.1.7.1 Uygun Hammadde Seçimi.....	23
1.1.7.2 Ürün Formülasyonu ya da Boyutunun Değiştirilmesi.....	24
1.1.7.3 Ön İşlemler Uygulamak ve Proses Parametrelerini Değiştirmek.....	26
1.1.8 Akrilamid Analiz Yöntemleri.....	33
1.1.8.1 Gaz Kromatografisi Metodu.....	34
1.1.8.2 Sıvı Kromatografisi Metodu.....	34
1.1.9 Geleneksel Türk Kahveleri.....	35
1.1.10 Kahve ve Aroma.....	37
1.1.10.1 Aroma Analizi Yöntemleri	39
1.1.11 Yanıt Yüzey Yöntemi.....	40
1.1.12 Kahve ile ilgili Tebliğler.....	41
1.2 Tezin Amacı.....	41
1.3 Hipotez.....	42
2 Materyal ve Yöntem	43
2.1 Materyal.....	43
2.1.1 Kahve numuneleri.....	43
2.1.2 Enzim.....	43
2.1.3 Alet Ekipman Tanımları.....	43
2.1.4 Kullanılan Kimyasallar.....	44
2.2 Yöntem.....	45
2.2.1 DeneySEL tasarım.....	46
2.2.2 Yeşil kahve çekirdeklerinin enzimle muamelesi ve kahve üretimi	48
2.2.3 Akrilamid Analizi.....	48
2.2.3.1 Akrilamid Standartlarının Hazırlanması.....	48
2.2.3.2 Akrilamid Analizi İçin Örnek Hazırlama.....	49

2.2.3.3	Kalibrasyon Eğrisi.....	50
2.2.3.4	Metod Validasyon Parametreleri.....	50
2.2.3.5	Analitik Koşullar.....	52
2.2.4	Serbest Amino Asit Analizi.....	52
2.2.4.1	Çözeltilerin Hazırlanması.....	52
2.2.4.2	Serbest Amino Asit Analizi İçin Örnek Hazırlama.....	52
2.2.4.3	Analitik Koşullar.....	53
2.2.5	Kafein Analizi.....	53
2.2.5.1	Çözeltilerin Hazırlanması.....	53
2.2.5.2	Analitik Koşullar.....	54
2.2.5.3	Numunenin Hazırlanması.....	54
2.2.6	HMF Analizi.....	55
2.2.6.1	Çözeltilerin Hazırlanması.....	55
2.2.6.2	Analitik Koşullar.....	55
2.2.6.3	Numunenin Hazırlanması.....	56
2.2.7	Şeker Analizi (glukoz, fruktoz, maltoz ve süktroz).....	56
2.2.7.1	Çözeltilerin Hazırlanması.....	56
2.2.7.2	HPLC Şartları.....	56
2.2.8	Protein Analizi.....	57
2.2.9	pH Analizi.....	57
2.2.10	Kül Analizi.....	57
2.2.11	Suda Çözünen Madde Tayini.....	57
2.2.12	Nem Analizi.....	58
2.2.13	Renk Analizi.....	58
2.2.14	Aroma Analizi.....	58
2.2.14.1	GC-QTOF-MS Koşulları.....	59
2.2.14.2	Aroma Bileşiklerinin Miktarlarının Hesaplanması.....	59
2.2.14.3	Alıkonma İndeksi.....	60
2.2.15	Duyusal Analiz.....	60
2.2.16	İstatiksel Analiz.....	61
3	Bulgular ve Tartışma	62
3.1	LC-MS/MS'de Akrilamid Analiz Yönteminin Validasyonu.....	62
3.1.1	Doğrusallığın Belirlenmesi.....	62

3.1.2	Yöntemin Saptama Sınırı ve Ölçme Sınırının Belirlenmesi.....	64
3.1.3	Kesinliğin Belirlenmesi.....	64
3.1.4	Geri Kazanım Yüzdesinin Belirlenmesi.....	64
3.2	Piyasadan Toplanan Kahve Örnekleri için Analiz Bulguları.....	64
3.2.1	Kahve Örneklerinin Akrilamid Miktarları	64
3.2.2	Kahve Örneklerinin HMF Miktarları	65
3.2.3	Kahve Örneklerinin Protein Oranları	66
3.2.4	Kahve Örneklerinin Şeker Oranları.....	66
3.2.5	Kahve Örneklerinin Kafein Oranları.....	67
3.2.6	Kahvelerin Nem Oranları.....	67
3.2.7	Kahve Örneklerinin pH Değerleri.....	67
3.2.8	Kahve Örneklerinin Kül Oranları.....	68
3.2.9	Kahve Örneklerinin Suda Çözünen Madde Oranları.....	68
3.2.10	Kahve Örneklerinin Kuru Madde Oranları.....	68
3.2.11	Kahve Örneklerinin Renk Değerleri (L^* , a^* , b^*).....	68
3.2.12	Akrilamid Seviyesi ile Diğer Parametreler Arasındaki Korelasyonlar.....	69
3.3	Üretilen Kahvelere İlişkin Bulgular.....	76
3.3.1	Asparaginaz Enzimi Uygulaması.....	76
3.3.2	Kahve Kavurması Sırasında Akrilamid Oluşumunun Engellenmesi	76
3.3.3	Üretilen Kahvelerin Renk Değerleri.....	85
3.3.4	Üretim Aşamasında Kahve Örneklerinin Nem Oranları	86
3.3.5	Üretim Aşamasında Kahve Örneklerinin Şeker Oranları.....	87
3.3.6	Üretilen Kahvelerin Uçucu Bileşen Profili.....	88
3.3.7	Üretilen Türk Kahvelerinin Duyusal Özellikleri.....	94
3.3.8	Kahvedeki Bazı Uçucu Pirazin Bileşenleri ve Akrilamid Konsantrasyonu Baz Alarak Yapılan Optimizasyonlar.....	95
4	Sonuç ve Öneriler	106
	Kaynakça	108
	Tezden Üretilmiş Yayınlar	124

SİMGE LİSTESİ

M	Molarite
N	Normalite
p	Güven Seviyesi
r	Korelasyon Katsayısı
R^2	Determinasyon Katsayısı
v/v/v	Hacim/Hacim/Hacim
w/w	Ağırlık/Ağırlık

KISALTMA LİSTESİ

ANOVA	Varyans Analizi
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
GC	Gaz Kromatografisi
GRAS	Genel Olarak Güvenilir Zararsız Kabul Edilen
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi
LOAEL	İstenmeyen yan etkinin gözlemlendiği en düşük düzey
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
LRI	Linear Alıkonma İndeksi
MKT	Merkezi Karma Tasarım
MS	Kütle Spektrometresi
NOAEL	Herhangi bir yan etkinin görülmediği en yüksek düzey
SCAA	Amerika Nitelikli Kahve Birliği
SÇM	Suda Çözünen Madde
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Akrilamidin yapısı	1
Şekil 1.2	Maillard reaksiyonuyla akrilamid oluşumu	4
Şekil 1.3	Akrilamidin gıdada temel oluşum yolları.....	5
Şekil 1.4	Akrilamidin asparajin üzerinden oluşumu.....	5
Şekil 1.5	Akrilamid toksisitesinin mekanizması	9
Şekil 1.6	Arabica ve Robusta kahve.....	10
Şekil 1.7	Kahve üretim prosesi.....	11
Şekil 1.8	Kahve kavurucu.....	12
Şekil 1.9	Kahve kavurma aşamalarında oluşan değişimler.....	13
Şekil 1.10	Kavurma süresinin kahvelerin akrilamid miktarına etkisi.....	14
Şekil 1.11	Aldehit ve keton gruplarının formülü.....	17
Şekil 1.12	D-glikozun zincir yapısı.....	18
Şekil 1.13	Fruktozun zincir yapısı.....	18
Şekil 1.14	Beta-alanin, serin ve sistein üzerinden akrilamid oluşum mekanizması	20
Şekil 1.15	Gliserolden akrolein oluşumu.....	22
Şekil 1.16	L-asparaginaz enziminin genel etki mekanizması.....	29
Şekil 1.17	Novozymes-Acrylaway®.....	32
Şekil 1.18	Geleneksel Türk kahvesi cezvesi ve fincanı.....	36
Şekil 1.19	Menengiç ve Dibek kahvesi.....	37
Şekil 1.20	Kahve aromasının oluşum mekanizması.....	38
Şekil 2.1	Piyasadan toplanan kahve örneklerinde gerçekleştirilen analizler.....	45
Şekil 2.2	Üretilen kahvelerde gerçekleştirilen analizler.....	46
Şekil 2.3	Yeşil kahve çekirdeklerinin tartılması (180 g) (a).....	48
Şekil 2.4	Öğütülmüş kahve örneği (a).....	49
Şekil 3.1	Akrilamid ve Akrilamid-d ₃ ile kirletilen yeşil kahve çekirdeklerine ait kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 3.2	100 µg/kg seviyesinde akrilamid ile kirletilmiş öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğinde (a) ve Türk kahvesi örneğinde (b) akrilamid yavru iyonlarına (m/z: 55,20 ve 27,20) ait kromatogramlar.....	63

Şekil 3.3	100 µg/kg seviyesinde akrilamid-d ₃ ile kirletilmiş öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğinde (a) ve Türk kahvesi örneğinde (b) akrilamid yavru iyonlarına (m/z: 58,15 ve 30,10) ait kromatogramlar.....	63
Şekil 3.4	Türk kahvesi örneğine (9 kod numaralı) ait HMF kromatogramı.....	65
Şekil 3.5	Türk kahvesi örneğine (4 kod numaralı) ait kafein kromatogramı....	67
Şekil 3.6	Üretilen kahveler.....	81
Şekil 3.7	Asparajin standardına (5 mg/kg) ait kromatogram.....	82
Şekil 3.8	Akrilamid için beklenen ve gözlenen değer arasındaki ilişki.....	84
Şekil 3.9	Akrilamide ait yüzey grafiği (3D görünümü).....	85
Şekil 3.10	(A) Enzim uygulanarak üretilen kahveye ait aroma profili (B) Enzim uygulanmadan üretilen kahveye ait aroma profili.....	94
Şekil 3.11	Kahve örneklerinin lezzet profil analiz sonuçlarının örümcek ağı diyagramı.....	95
Şekil 3.12	(a) 2-Metilpirazin (b) 2,3-Dimetilpirazin (c) 2,5-Dimetilpirazin (d) 2-Asetil-3-Metilpirazine ait Yüzey Grafiği (3D görünümü).....	105

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Bazı gıda gruplarının akrilamid seviyeleri.....	9
Tablo 1.2	L^* renk değerine göre kavurma dereceleri	12
Tablo 1.3	Acrylaway® L Enziminin Yeşil Kahve Çekirdeklerine Uygulanma Basamakları.....	29
Tablo 1.4	Avrupa’da uygulanan akrilamid analiz yöntemleri.....	33
Tablo 2.1	Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri.....	47
Tablo 2.2	Uygulanan merkezi karma tasarım.....	47
Tablo 2.3	Kalibrasyon eğrisi eldesi için kullanılan standartlar ve hacimleri.....	50
Tablo 3.1	Türk kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz, toplam indirgen şeker ve sükroz değerleri ^a	71
Tablo 3.2	Dibek kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz toplam indirgen şeker ve sükroz değerleri ^a	72
Tablo 3.3	Menengiç kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz, toplam indirgen şeker ve sükroz değerleri ^a	73
Tablo 3.4	Türk kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri ^a	73
Tablo 3.5	Dibek kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri ^a	75
Tablo 3.6	Menengiç kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri ^a	75
Tablo 3.7	Akrilamid Analiz Sonuçları	76
Tablo 3.8	Kurutma aşamasından sonra yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin konsantrasyonları	81
Tablo 3.9	Akrilamid Yanıtı için ANOVA sonuçları.....	82
Tablo 3.10	Kuadratik model için istatistiksel verilerin özeti.....	84
Tablo 3.11	Üretilen kahvelerin renk değerleri	85
Tablo 3.12	Kahve Örneklerinin Nem Oranları.....	86
Tablo 3.13	Kurutma aşamasından sonra yeşil kahve çekirdeklerinin glikoz, fruktoz ve sükroz seviyeleri	87
Tablo 3.14	Enzim Uygulanarak ve Enzim Uygulanmadan Üretilen Kahvelerde Belirlenen Uçucu Aroma Bileşikleri	88

Tablo 3.15 Pişirilen kahve örneklerinin lezzet profili analizi sonuçları.....	94
Tablo 3.16 Bağımlı değişkenlere ait merkezi karma tasarım sonucu elde edilen veriler	96
Tablo 3.17 2-Metilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları.....	98
Tablo 3.18 2-Metilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri.....	98
Tablo 3.19 2,3-Dimetilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları.....	99
Tablo 3.20 2,3-Dimetilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri.....	100
Tablo 3.21 2,5-Dimetilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları.....	101
Tablo 3.22 2,5-Dimetilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri.....	102
Tablo 3.23 2-Asetil-3-Metilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları.....	103
Tablo 3.24 2-Asetil-3-Metilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri	103

Türk Kahvesinin Akrilamid İçeriği ile Asparaginaz Enziminin Akrilamid Oluşumu ve Uçucu Bileşikler Profiline Etkileri

Banu AKGÜN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Bu çalışmada, Türk kahvesinde ve piyasada satılan diğer yöresel kahvelerde (dibek ve menengiç) akrilamid düzeylerini ve bazı fiziko-kimyasal özelliklerini tespit etmek ve Türk kahvesi üretiminin model olarak kullanıldığı sistemde yeşil kahve çekirdeklerini asparaginaz enzimi ile muamele etmenin üründe oluşan akrilamid miktarına, ürünün aroma profiline ve duyuşsal özelliklerine olan etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

Tez çalışmasında ilk olarak, piyasadan toplanan kahve örneklerinde (20 Türk kahvesi, 8 dibek kahvesi, 8 menengiç kahvesi) akrilamid, kuru madde, kül, suda çözünen madde (SÇM), HMF, protein, şeker, nem, pH, renk ve kafein analizleri yapılmış ve akrilamid seviyesi ile bu parametreler arasındaki korelasyonlar araştırılmıştır. Öncesinde, kahvelerin akrilamid seviyesini güvenilir bir şekilde belirlemek için LC-MS/MS cihazında validasyon çalışması yapılmıştır. Lineer regresyon analizine göre kalibrasyon eğrisinin 30-1000 $\mu\text{g/kg}$ aralığında yüksek determinasyon katsayısına ($R^2=0,999$) sahip olduğu saptanmıştır. Yöntemin tespit limiti (LOD) ve ölçüm limitinin (LOQ) sırasıyla 4,6 $\mu\text{g/kg}$ ve 15,5 $\mu\text{g/kg}$ olduğu bulunmuştur. Kahve örneklerinin akrilamid konsantrasyonunun $31,1 \pm 0,6$ $\mu\text{g/kg}$ ile $323,4 \pm 5,4$ $\mu\text{g/kg}$ arasında değiştiği belirlenmiştir. Menengiç kahvesinde saptanan ortalama akrilamid seviyesinin (240,3 $\mu\text{g/kg}$), Türk kahvesi (204,3 $\mu\text{g/kg}$) ve dibek kahvesine (78,6 $\mu\text{g/kg}$) oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kahvelerin akrilamid ve HMF seviyeleri arasında pozitif korelasyonlar (Türk kahvesinde ($r=0,698$, $p<0,01$), dibek kahvesinde ($r=0,932$, $p<0,01$) ve menengiç kahvesinde ($r=0,957$, $p<0,01$)) olduğu belirlenmiştir. Kahve örneklerinin düşük miktarda glikoz ve fruktoz öte yandan nispeten daha yüksek miktarda sükroz içerdiği saptanmıştır. Ayrıca, kahvelerin sükroz ve akrilamid seviyeleri arasında istatistiksel olarak pozitif ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmanın ikinci kısmında, yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak asparaginaz enzimi konsantrasyonunun (0-4000 ASNU) ve uygulama süresinin (30-120

dakika) kahvelerde akrilamid oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu işlemin optimizasyonu için merkezi karma tasarım (MKT) kullanılmıştır. İstatistiksel optimizasyona göre 3110,2 ASNU dozunda asparaginaz enzimiyle 80,4 dakika muamele edilen yeşil kahve çekirdeklerinde minimum akrilamid oluşumu meydana geldiği saptanırken yeşil kahve çekirdeğindeki (enzim uygulanıp kurutulan) asparajin miktarı ve kavrulan kahvelerde akrilamid oluşumu arasında pozitif ilişki ($r=0,669$, $p<0,01$) bulunmuştur.

Elde edilen optimum koşullarda enzim uygulanarak ve enzim uygulanmadan standart koşullarda üretilen kahvelerin aroma profili ve duyuşal özellikleri karşılaştırılmıştır. Panelistler kahvelerin incelenen duyuşal özelliklerinde (kahve aroması, yanık/dumansı, kavrulmuş, meyvemsi, acılık, karamel/tatlı, genel izlenim/beğeni) önemli bir farklılık saptamamışlardır. Her iki kahve örneğinde benzer aroma bileşenleri izole edilmiş ve aroma maddelerinin toplam miktarının enzim uygulaması ile bir miktar azaldığı belirlenmiştir. Türk kahvesindeki aroma bileşiklerinin büyük bir kısmını furan, pirazin, aldehit, fenol, ester, terpen, alkol ve pirol bileşikleri oluşturmuş, bunları asit, piridin ve lakton bileşikleri izlemiştir.

Yapılan bir diğer optimizasyon çalışmasında, üretilen Türk kahvesinde yüksek seviyede uçucu pirazin bileşenleri (2-Metilpirazin, 2,3-Dimetilpirazin, 2,5-Dimetilpirazin ve 2-Asetil-3-metilpirazin) ve minimum seviyede akrilamid eldesi için yeşil kahveye en optimum enzim uygulama şartlarının (doz ve uygulama süresi) 2126,4 ASNU ve 82,73 dakika olduğu saptanmıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, asparaginaz enzimi dozu ve uygulama süresinin kahvedeki akrilamid oluşumunu etkilediği ve akrilamid konsantrasyonu düşük Türk kahvesi eldesi için en uygun enzim uygulama koşulunun 3110,2 ASNU ve 80,4 dakika olduğu bulunmuştur. Ayrıca, düşük seviyede akrilamid ve yüksek seviyede pirazin bileşenleri içeren Türk kahvesi üretimi için en ideal asparaginaz enzimi uygulama şartları 2126,4 ASNU ve 82,73 dakika olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Türk kahvesi, LC-MS/MS, asparaginaz, aroma profili

Acrylamide Content in Turkish Coffee and the Effect of Asparaginase Enzyme on Acrylamide Formation and Volatile Compounds Profile

Banu AKGÜN

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

The aim of this study is to determine acrylamide levels and physico-chemical properties of Turkish coffee and other local coffees (Dibek and Terebinth) sold in the Turkish market and is to evaluate the effects of treating green coffee beans with asparaginase enzyme on the amount of acrylamide, aroma profile and sensory properties of the product in which Turkish coffee production is used as a model.

First in thesis study, acrylamide concentrations, dry matter, ash, water soluble substance, pH, HMF, protein, sugar, moisture, caffeine content and colour values of commercially available coffee samples (20 Turkish coffee, 8 Dibek coffee, 8 Terebinth coffee) were measured and correlations between the acrylamide level and these parameters were investigated. In order to determine the acrylamide level of coffees safely, a validation study was performed on LC-MS/MS. According to linear regression analysis, the calibration curve has a high coefficient of determination ($R^2=0,999$) in the range of 30-1.000 $\mu\text{g/kg}$. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were found to be 4,6 $\mu\text{g/kg}$ and 15,5 $\mu\text{g/kg}$, respectively. It was observed that the acrylamide concentration of coffee samples ranged from $31,1 \pm 0,6$ to $323,4 \pm 5,4$ $\mu\text{g/kg}$. The average acrylamide level (240,3 $\mu\text{g/kg}$) detected in Terebinth coffee was higher than Turkish coffee (204,3 $\mu\text{g/kg}$) and Dibek coffee (78,6 $\mu\text{g/kg}$). Positive correlations (for Turkish coffee ($r=0,698$, $p<0,01$), for Dibek coffee ($r=0,932$, $p<0,01$) and for Terebinth coffee ($r=0,957$, $p<0,01$)) were found between acrylamide and HMF concentration of coffees. It was found that coffees contain low amounts of glucose and fructose but a relatively high amount of sucrose. In addition, a positive relationship was found between sucrose and acrylamide levels of coffees.

In the second part of the study, the effects of asparaginase enzyme concentration (0-4000 ASNU/kg coffee bean) and application time (30-120 minutes) on the

concentrations of acrylamide of coffee were observed by using response surface methodology. The central composite design (CCD) was used to optimize this process. According to the statistical optimization, minimum acrylamide formation occurred in green coffee beans treated with asparaginase enzyme dosage of 3110,2 ASNU for 80,4 minutes, and a positive correlation ($r=0,669$, $p<0,01$) was found between the amount of asparagine in green coffee (enzymes applied and dried) bean and the formation of acrylamide in roasted coffee.

The aroma profile and sensory properties of the coffees produced under standard conditions without enzyme application and with enzyme application under optimum conditions were compared. Panelists found no significant difference in the sensory properties of coffee (coffee aroma, burn/smoke, roasted, fruity, bitterness, caramel/sweet, general impression/taste). Similar aroma components were isolated in both coffee samples and it was determined that the total amount of aroma compounds decreased slightly with enzyme application. Most of the aroma compounds in Turkish coffee consisted of furan, pyrazine, aldehyde, phenol, ester, terpene, alcohol and pyrrole compounds followed by acid, pyridine and lactone compounds.

In another optimization study, the most optimum enzyme application conditions (dose and application time) to obtain the highest level volatile pyrazine compounds (2-Methylpyrazine, 2,3-Dimethylpyrazine, 2,5-Dimethylpyrazine and 2-Acetyl-3-methylpyrazine) and minimum level acrylamide in produced Turkish coffee was determined as 2126.4 ASNU and 82.73 minutes.

According to findings, asparaginase enzyme dose and application time affect the formation of acrylamide in coffee and the most suitable enzyme application condition for obtaining Turkish coffee with the lowest acrylamide concentration was 3110.2 ASNU and 80.4 minutes. Furthermore, an ideal condition for producing Turkish coffee with the lowest levels of acrylamide and the highest levels of pyrazine compounds was determined as 2126.4 ASNU and 82.73 minutes.

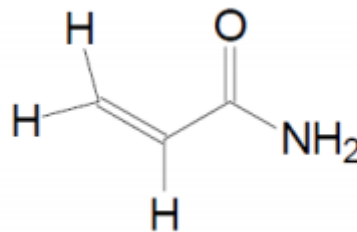
Key Words: Acrylamide, Turkish coffee, LC-MS/MS, asparaginase, aroma profile

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Akrilamid

Gıdaların duyuusal özelliklerini iyileştirmek ve güvenliğini artırmak için ısı işlemler geçmişten günümüze evsel ve endüstriyel boyutta uygulanmaktadır. Yüksek sıcaklık, kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla gıdalarda yeni bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır (Park ve Penning, 2009). Oluşan bu moleküllerin bazılarının sağlık açısından pozitif etkileri bulunurken bazılarının (akrilamid gibi) toksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Studer vd., 2004).

Akrilamid (2-propenamid) çift bağ içeren reaktif doymamış bir amittir (Şekil 1.1). Yapısındaki çift bağdan dolayı amino (-NH₂) ve sülfhidril (-SH) gruplarıyla bağ kurmaya yatkınlık göstermektedir (Friedman, 2003). Akrilamid, molekül ağırlığı 71,08 g/mol, erime noktası 84,5°C, kaynama noktası 192,6°C olan kokusuz beyaz renkli kristal yapılı katı bir bileşiktir. Polar bir madde olan akrilamid, polar çözücülerin (su, metanol ve etanol gibi) içinde kolayca çözünmektedir (Skog ve Alexander, 2006). Akrilamid, birçok sektörde karşımıza çıkmaktadır çünkü bu kimyasal sanayide farklı amaçlar (içme ve atık sularının arıtılması, kâğıt, boya ve plastik madde üretimi gibi) için kullanılan poliakrilamidlerin monomeridir (Saboktakin, 2012).



Şekil 1.1 Akrilamidin yapısı (Girma vd., 2005)

Uluslararası Kansere Araştırmaları Kurumu (IARC) akrilamidi 1994 yılında "insanlar için olası kanserojen" Grup 2A sınıfına almıştır (IARC, 1994). İsveç Ulusal Gıda Örgütü Stockholm Üniversitesi ile birlikte 2002 yılında ısıtma işlemi (fırınlama, kavurma ve kızartma gibi) gören nişasta bazlı gıdalarda akrilamid bulgusuna rastladıklarını raporlayana kadar akrilamid çevresel bir kontaminant olarak kabul edilmekteydi (Tareke vd., 2002)

Vücuda alınan akrilamidin sağlık üzerine etkileri genotoksik, karsinojenik, nörotoksik, üreme ve gelişme sistemi üzerine toksik olarak ayrılmaktadır (WHO, 2002). Genotoksik metabolitlerin, oksidatif stresin ve merkezi sinir sisteminde histolojik hataların meydana gelmesi akrilamidin toksik etkilerinin oluşmasına aracılık ettiği bilinmektedir (LoPachin, 2004). Yapılan çalışmalarda, akrilamidin nörotoksik etkileri hem insan ve hayvanlarda, genotoksik, karsinojenik ve üreme sistemi üzerine toksik etkileri ise sadece hayvanlarda gözlemlenmiştir (Shipp vd., 2006).

Akrilamid maruziyeti popülasyona, tüketicilerin yaşlarına ve yeme tercihlerine göre farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunun, günlük ortalama akrilamid alımının 0,14 ile 1,31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı arasında, Amerika'da ise 0,43 ile 1,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı arasında değiştiği raporlanmıştır (Dybing ve Sanner, 2003; Semla vd., 2017). Ayrıca, düşük vücut ağırlığı ve tüketim tercihlerinden dolayı genç insanların yetişkinlere göre daha fazla akrilamide maruz kaldığını gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır (Mojska vd., 2010; FSA, 2012).

Tardiff vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada nörotoksisite açısından tolere edilebilir günlük akrilamid alım değerini 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı/gün olarak hesaplamışlardır. Kansere riski açısından tolere edilebilir günlük alım düzeyinin akrilamid için 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı/gün ve metaboliti olan glisidamid için 16,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı/gün olduğu belirlenmiştir.

Akrilamidin ülkemizde ve Avrupa Birliği mevzuatında yer alan yasal bir limiti bulunmamaktadır. Ancak gıdalardaki akrilamid seviyesi Avrupa'da yetkililer tarafından kontrol edilmektedir ve gelecekte akrilamid için maksimum limitlerin belirlenmesi muhtemeldir (EFSA, 2012).

1.1.2 Akrilamid Oluşum Mekanizmaları

Akrilamidin, IARC tarafından "insanlar için muhtemel kanserojen" madde grubuna dâhil edilmesinden sonra bu kimyasalın oluşum mekanizmasını anlamak için birçok çalışma yapılmıştır (Eriksson, 2005). Akrilamidin tüm oluşum yolları bilinmese de, temel olarak Maillard reaksiyonuyla ve daha sınırlı olsa da Maillard reaksiyonu dışındaki bazı minör yollarla oluştuğu bilinmektedir (Stadler ve Studer, 2015).

1.1.2.1 Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşumu

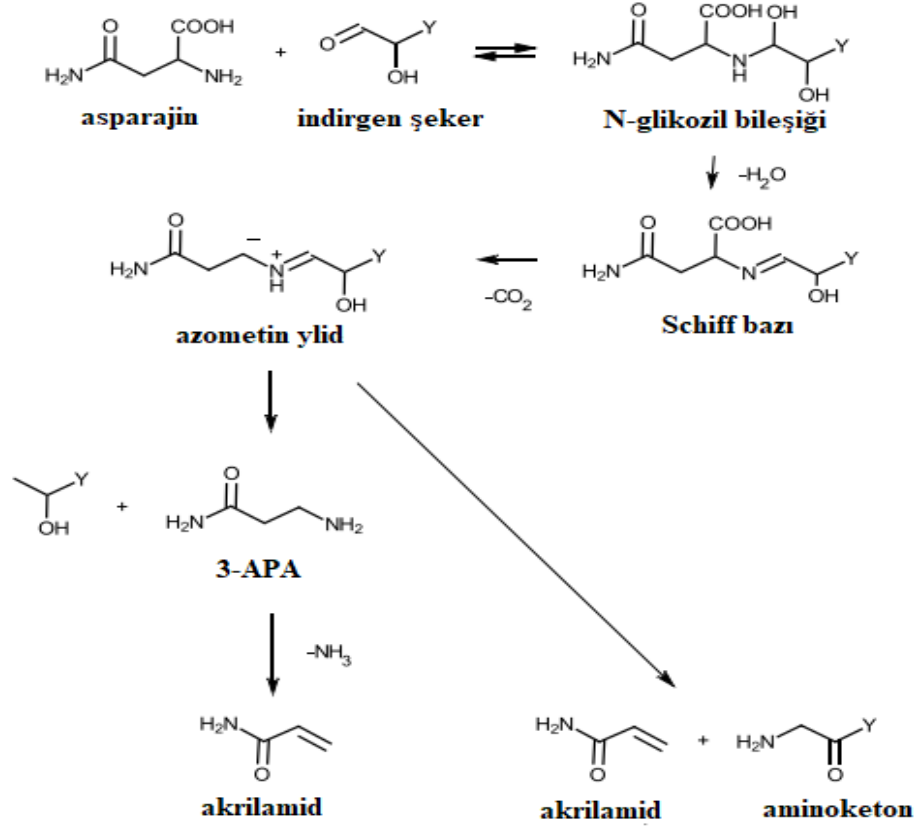
Maillard reaksiyonu, karamelizasyon gibi enzimatik olmayan esmerleşmenin bir çeşididir ve gıdalardaki serbest aminoasitlerin, proteinlerin veya peptitlerin serbest amino grubu ($-NH_2$) ile indirgen şekerlerin karbonil grubu ($C=O$) arasında genellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir (Arusoğlu, 2015). Akrilamid, Maillard reaksiyonunun en bilinen ürünlerinden biridir (Yıldız vd., 2010).

α -hidroksi karbonil bileşiklerinin (örneğin glikoz ve fruktoz) diğer karbonilik bileşiklerden Maillard reaksiyonlarında daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Bu moleküllerin Maillard reaksiyonundaki genel aktivasyon enerjisini düşürmesi asparajın degradasyonunda etkili olmasını sağlamıştır (Eriksson, 2005). Ayrıca, patates ürünlerinde indirgen şekerin akrilamid oluşumunda temel sınırlayıcı faktör olduğunu gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014).

Model sistemlerde yapılan çalışmalarda, fruktoz ve glikoz bulunan sistemlere asparajın eklendiği zaman eşit miktarlarda akrilamid oluşurken, sükroz bulunan sistemde daha az miktarda akrilamid oluştuğu görülmüştür (Stadler vd., 2004). Öte yandan bazı raporlarda, glikoz içeren karışımlarda fruktoza göre daha az akrilamid oluştuğu açıklanmıştır. Bu durumun nedeni, erime noktası düşük olan fruktozun hareketliliğinin fazla olması ve dolayısıyla hızlı bir şekilde öncü maddelerle etkileşime girmesi olarak görülmektedir (Yaylayan vd., 2005).

Maillard reaksiyonuyla akrilamid oluşum mekanizmasında bir karbonil kaynağı ile asparajinin amino grubu arasında Schiff bazı oluştuğu ve sonrasında Schiff bazının yüksek sıcaklık etkisi ile dekarboksile olarak akrilamide dönüştüğü

düşünülmektedir (Şekil 1.2) (Alpözen, 2012). Bu karbonil kaynağı indirgen şekerler veya lipid oksidasyon ürünleri olabilmektedir (Vural, 2016).

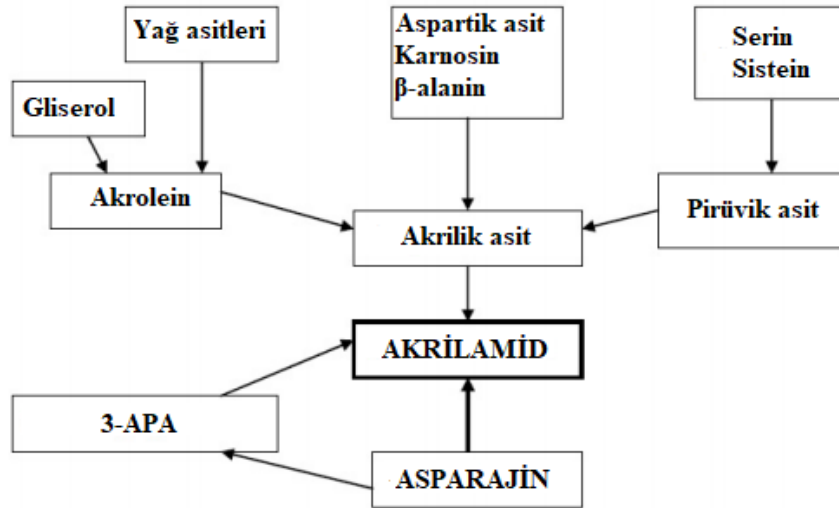


Şekil 1.2 Maillard reaksiyonuyla akrilamid oluşumu (Stadler vd., 2004)

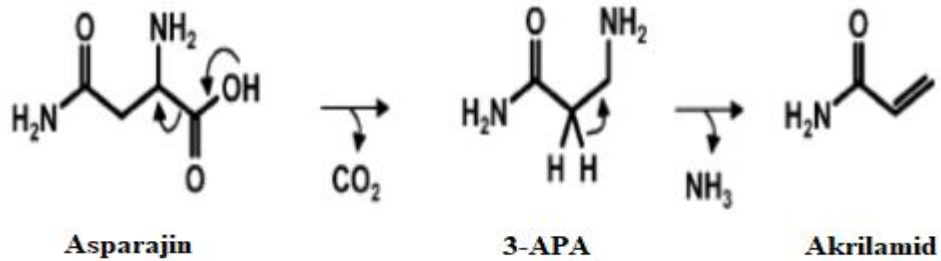
1.1.2.2 Alternatif Yollar Üzerinden Akrilamid Oluşumu

Gıdalarda akrilamid oluşumu temel olarak indirgen şekerler ve asparajin amino asidi üzerinden olsa da akrolein ve amonyak (NH_3) üzerinden alternatif oluşum yolları da bulunmaktadır (Şekil 1.3) (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014). Asparajin yokluğunda, akrolein ve amonyak yağ içeriği yüksek gıdalarda akrilamid oluşumunda rol oynamaktadır. Akrolein ve akrilik asit yüksek sıcaklıkta yağların (trigliseritlerin) degradasyonu ile oluşmaktadır (Umano ve Shibamoto, 1987). Akrolein, düşük kaynama noktasına ($51^\circ C$) sahip olduğu için yüksek sıcaklıklardaki kızartma koşullarında hızlı bir şekilde uçucu hale gelmektedir. Akrolein okside olarak, akrilik aside yükseltgenmekte ve amonyak ile reaksiyona girerek yine akrilamid oluşturabilmektedir (Taeyman vd., 2004). Ayrıca, akrolein belirli koşullar altında asparajin ile reaksiyona girip önemli miktarda akrilamid

oluşumuna neden olabilmektedir. Glutamin, sistein ve aspartik asit gibi amino asitlerin de düşük miktarlarda akrilamid ürettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sohn ve Ho, 1995). Ayrıca indirgen şekerlerin yokluğunda, dekarboksile olmuş asparajin yani 3-aminopropiyonamid (3-APA) bileşiği üzerinden akrilamid oluşabilmektedir (Şekil 1.4) (Zhang vd., 2005).



Şekil 1.3 Akrilamidin gıdada temel oluşum yolları (Eriksson, 2005)



Şekil 1.4 Akrilamidin asparajin üzerinden oluşumu (Granvogl ve Schieberle, 2006)

1.1.3 Akrilamidin Sağlık Üzerine Etkileri

Akrilamid, nükleofiller tarafından saldırıya uğrayabilen elektrofilik vinil gruba sahip küçük bir organik moleküldür. Akrilamidin sıçanlarda deri yoluyla bir kısmının absorbe edilebildiği gastrointestinal yoldan ise tamamiyle hızlı bir şekilde alındığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Dearfield vd., 1988).

Toksikokinetik araştırmalar, akrilamidin insanlarda 2,4-7,0 saatlik bir eliminasyon yarı ömrüne sahip olduğunu göstermiştir (Zamani vd., 2017). İnsanlarda vücuda alınan akrilamid sindirim sistemi boyunca yeterli düzeyde redükte glutatyon (GSH) bulunuyorsa akrilamid-glutatyon formuna dönüştürölerek etkisiz hale getirilmekte ya da sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) enzim sistemi aracılığıyla okside edilerek çok daha toksik bir madde olan glisidamide metabolize edilmektedir. Epoksi halkası içeren glisidamid DNA ve proteine karşı oldukça reaktif durumdadır (Friedman, 2003). Gıda kaynaklı ve gıda kaynaklı olmayan yollardan vücuda alınan akrilamidin sağlık üzerine etkileri toksikolojik ve karsinogenik olarak ayrılmaktadır.

1.1.3.1 Nörotoksik Etkileri

Akrilamidin nörotoksik yan etkileri hem insanlarda hem de hayvanlarda gözlemlenmiştir. Laboratuar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda akrilamidin nörotoksisite açasından gözlenebilir bir yan etki oluşturmayan en yüksek düzeyinin (NOAEL) ve gözlenebilir en düşük yan etki düzeyinin (LOAEL) sırasıyla 0,2-0,5 ve 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğu bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü tarafından insanların diyetssel ortalama akrilamid maruziyetinin 0,001 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğu tahmin edilmektedir (Zamani vd., 2017). Bu seviyenin nörotoksisite açasından güvenli olduğu düşünölse dahi bazı uzmanlar bu dozlardaki akrilamide uzun süreli maruz kalmanın oluşturacağı kümülatif etkilerden dolayı tehlikeli olabileceğini belirtmektedirler (LoPachin, 2004). Akrilamidin nörotoksisitesi, hem insanlarda hem de hayvanlarda görülen tek toksik etkidir. Kedi, sıçan, fare, tavşan ve maymun gibi çeşitli hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, akrilamide günlük olarak tekrar tekrar maruz kalmanın ataksi ve iskelet kası zayıflığı gibi etkilerle sonuçlanabileceğini ortaya çıkarmıştır (Exon, 2006).

Akrilamide mesleki olarak maruz kalan insanlarda oluşan nörotoksik etkiler çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Örneğin, İsveç yakınındaki bir demiryolu tüneli yapımında işçilerin sinir fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelmiş ve bu durumun tünel duvarını su geçirmez hale getirmek için kullanılan akrilamid içeren

Rhoca-Gel adlı özel bir jelden kaynaklandığı saptanmıştır (Hagmar vd., 2001). Akrilamid kaynaklı nörotoksisitenin altında yatan mekanizmayı anlamak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Öne sürülen temel hipotez akrilamidin kinezin isimli motor proteinlerine bağlanarak sinir aksonları arasındaki hızlı sinyal iletimini baskılaması olduğu bulunmuştur (Sickles vd., 1996).

1.1.3.2 Kanserojenik ve Genotoksik Etkileri

Akrilamid, insanlar için muhtemel kanserojen grubunda yer almaktadır (IARC, 1994). İçme suyuyla akrilamide maruz kalan kemirgenlerde birden fazla bölgede tümör gelişimi gözlenmiş olsa da insanlarda görülen çeşitli kanser türleri (pankreas, prostat, meme ve yumurtalık) ile akrilamid alımı arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmamıştır (Wilson vd., 2012; Kumar vd., 2018). Benzer şekilde, Obon-Santacana vd. (2016) akrilamid-hemoglobin ve glisidamid-hemoglobin eklenti (addüktör) seviyeleri ile endometrium kanseri oluşum riski arasında bir ilişki bulamamışlardır. Yine, Kumar vd. (2018) akrilamid alımı ve epitelyal over kanseri riski arasında net bir ilişki saptamamışlardır.

Akrilamidin kanser riskini artırdığını gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014). Akrilamid maruziyetiyle böbrek, rahim ve yumurtalık kanseri riskinin arttığını gösteren bazı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Hogervorst vd. (2008) diyetset akrilamid alımıyla renal hücreli kanser oluşumu arasında pozitif korelasyon bulurken mesane ve prostat kanseri oluşumu arasında bir ilişki saptamamışlardır. Liu vd. (2017) yaptığı bir çalışmada yaşlılarda diyetset akrilamid alımıyla genel kanser mortalitesinin artışı arasında pozitif ilişki bulmuşlardır.

Genetik hasar üretme kapasitesi kanserojenlik değerlendirmesinde önemli parametrelerden birisidir. Akrilamidin ve metaboliti olan glisidamidin genotoksitesisi çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Akrilamidin, DNA'ya zarar verdiğini kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır (WHO, 2002; Alzahrani, 2011).

Akrilamidin bakteride gen mutasyonuna neden olmadığı gözlemlenirken glisidamidin metabolik aktivasyon yokluğunda gen mutasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Akrilamid, memeli hücrelerinde gen mutasyonlarını indüklemesi

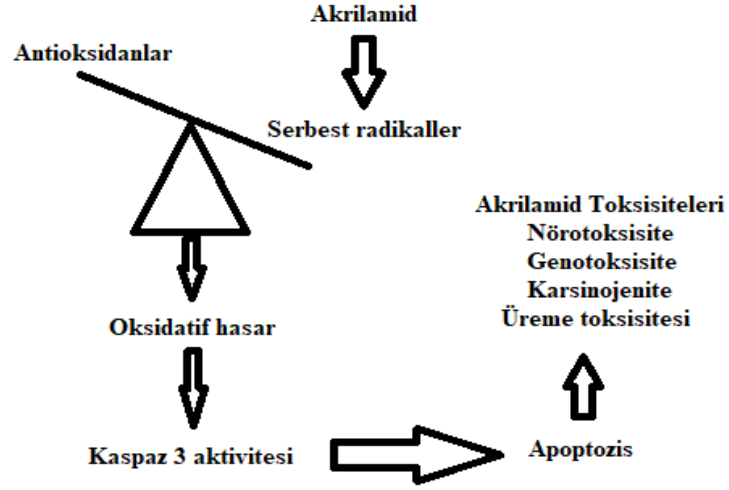
açısından test edildiğinde etkisiz, negatif veya zayıf pozitif sonuçlar ortaya koymuştur. Akrilamidin, metabolik aktivasyon yokluğunda memeli hücrelerinde kromozomal sapmaları, kardeş kromatit değişimleri ve diğer mitotik bozuklukları (rneğin C-mitoz) indüklediği gözlemlenmiştir (WHO, 2002).

1.1.3.3 Üreme ve Gelişim Sistemi zerine Toksik Etkileri

Akrilamidin insanlarda üreme toksisitesi oluşturduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Kemirgenler üzerinde yapılan üreme toksisitesi testleri sonucunda akrilamid için NOAEL değerinin 2-5 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğu bulunmuştur. Bu doz günlük akrilamid alım miktarının çok üzerindedir (Arisseto, ve Vicente, 2015). Ayrıca, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında günlük 0,5-10 mg/kg dozda akrilamid verilen farelerin sperm rezervelerinin azaldığı saptanmıştır (Wang vd., 2010).

1.1.4 Akrilamid Toksisitesinin Mekanizması

Biyolojik oksidan/antioksidan oranında bir dengesizlik olduğunda oksidatif stres oluşabilmektedir. Bu durum, birçok hastalığın oluşmasında ilk adım olabilmektedir. Aslında, serbest radikaller hücrede sürekli olarak üretilmektedir (Jin vd., 2014; Zamani vd., 2017) ve serbest radikallerin olumsuz etkilerini ntrolize etmek için vücut bazı koruyucu bariyerlere sahiptir (antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutathion S-transferaz, glutathion peroksidaz) ve GSH gibi proteinler) (Yousef ve El-Demerdash, 2006; Shaki vd., 2012). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar akrilamidin oksidatif stresi indüklediğini ve hücresel redoks zincirini etkileyip reaktif oksijen türlerini (ROS) retebildiğini göstermektedir. Akrilamid ve glisidamid hücrelerdeki nükleofiller gruplar (-SH, -NH₂ veya -OH gibi) ile etkileşime girebilmektedir ve bu kimyasallar oksidatif stres sonucunda apoptosize (programlı hücre ölümü) neden olmaktadır (şekil 1.5).



Şekil 1.5 Akrilamid toksisitesinin mekanizması (Zamani vd., 2017)

1.1.5 Akrilamidin Oluştuğu Gıdalar

Gıdaların akrilamid seviyesini belirlemek için yapılmış literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara göre, diyetel akrilamid alımının %90'ı patates kızartması, patates cipsi, kahve, ekmek, bisküvi ve kahvaltılık gevrekler gibi ürünlerden kaynaklanmaktadır (Svensson vd., 2003; Konings vd., 2003). Tablo 1.1'de 2007 yılında yapılan bir piyasa taraması sonucunda elde edilen bazı gıda gruplarına ait akrilamid verileri görülmektedir.

Tablo 1.1 Bazı gıda gruplarının akrilamid seviyeleri (EFSA, 2012)

Gıdanın adı	Örnek sayısı	Ortalama ($\mu\text{g/kg}$)	Maksimum ($\mu\text{g/kg}$)
Patates cipsi	293	551	4180
Patates kızartması (tüketime hazır)	648	356	2668
Kavrulmuş kahve	175	256	1158
Çözünebilir kahve	52	229	1047
Kahve ve kahve ikamesi	312	373	4700
Bisküvi	79	174	1215
Zencefilli ekmek	458	387	3615
Yumuşak Ekmek	176	75	1778
Çıtır Ekmek	198	232	2430

Kahvaltılık gevrek	144	149	1600
Pastalar ve kekler	63	140	910
Müsli	47	241	1315

1.1.5.1 Kahve ve Kahve İkamesi

Kahvenin gerek ticari olarak gerekse sosyal hayatta oynadığı rol açısından dünya üzerinde en popüler içeceklerden biri olduğu aşikârdır. Kökboyasığiller (Rubiaceae) familyasına ait olan kahvenin dünyada 100'ün üzerinde farklı türü bulunmaktadır ancak ticari olarak en fazla öneme sahip olanlar *Coffea arabica* (Arabica) ve *Coffea canephora var. robusta* (Robusta)'dır (Şekil 1.6). Dünya kahve ihtiyacının %64'ü Arabica, %35'i Robusta ve %1'i ticari olarak değeri olmayan *Coffea liberica* (Liberika) ve *Coffea excelsa* gibi türlerden karşılanmaktadır (Rubayiza ve Meurens, 2005; Ayseli, 2015).

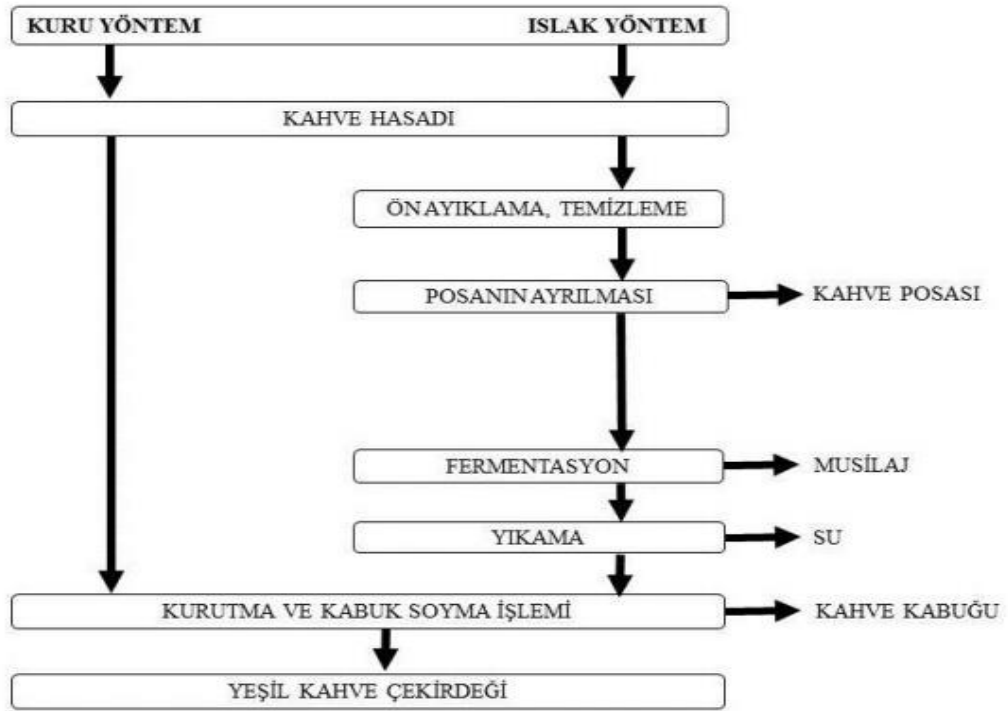
Arabica kahve çekirdeğinin yetiştirilme rakımı 600-2.500 metre arasındadır ve yetişmek için bolca neme, güneşe ve zengin alivyonlu toprağa ihtiyaç duymaktadır. Arabica diğer kahve türlerine göre, haşerelere karşı daha savunmasız, narin ve kırılgandır. Arabica kahvenin tarımının zor olması paralelinde fiyatının yüksek olmasına neden olmaktadır. Pahalı olmasına rağmen dünya kahve ihtiyacının önemli bir kısmının Arabica'dan karşılanması tat bakımından geniş bir skalaya sahip olmasından dolayıdır. Arabica, Robustaya göre daha fazla şeker ve yağ, daha az kafein içermektedir, Robusta kahvenin tadı Arabica'dan daha sert ve acıdır (Gök, 2018).



Şekil 1.6 Arabica ve Robusta kahve

Aslında bir meyve olan kahvenin çekirdek haline gelene kadar uzun bir yolculuğu vardır. Şekil 1.7'de gösterildiği şekilde olgunlaşan kahve kirazı hasat edildikten sonra öncelikle kabukları çeşitli yöntemlerle (ıslak ve kuru işleme) ayrılmaktadır

(Ülger, 2015). Uygulanan yöntemle kahvenin problemsiz bir şekilde sevk edilebilmesi için işlem sonunda kahvenin nem oranının %10-12 arasına düşmüş olması gerekmektedir. Kahvenin nem oranı ne kadar düşükse sevkiyatı o kadar risksiz olmaktadır ancak nem oranının çok fazla düşürülmesi ürünün ağırlığının azalması anlamına geldiği için ekonomik kayıplar oluşturabilmektedir. Islak işleme metodunun bir parçası olarak çekirdekler tanklarda bekletilirken doğal enzimlerce soyulması aşaması fermentasyon olarak adlandırılmaktadır (Gök, 2018).



Kırmızılaşan kahve kirazları toplanır



Kırmızılaşan kabuklar çeşitli tekniklerle uzaklaştırılır



Çekirdekler kavurulur ve öğütülür

Şekil 1.7 Kahve üretim prosesi (Ülger, 2015; Rattan vd., 2015)

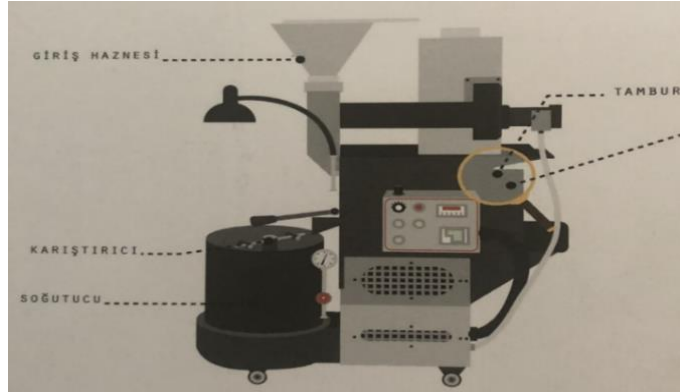
Çekirdekler kurutulduktan sonra bir sonraki basamak kavurma aşamasıdır. Kavurma, kahvenin lezzetini ve tat parametrelerini etkileyen en önemli aşamalardan biridir (Tin, 2006). Kavurma işlemi yeşil kahve çekirdeklerinin

aromalarını ortaya çıkarmak amacıyla yakılmasından oluşmaktadır. Kahvelerin kavurma derecesi farklı olabilmektedir. Tablo 1.2’de belirtildiği üzere kavurma derecesi; L^* renk değerine göre çok açık, orta açık, orta, orta koyu, koyu, çok koyu olarak ayrılmaktadır

Tablo 1.2 L^* renk değerine göre kavurma dereceleri (Fikry vd., 2019)

L^* değeri	Kavurma İndeksi
≥ 57	Çok açık
42-56,99	Orta açık
37-41,99	Orta
29-36,99	Orta koyu
20,1-28,99	Koyu
≤ 20	Çok koyu

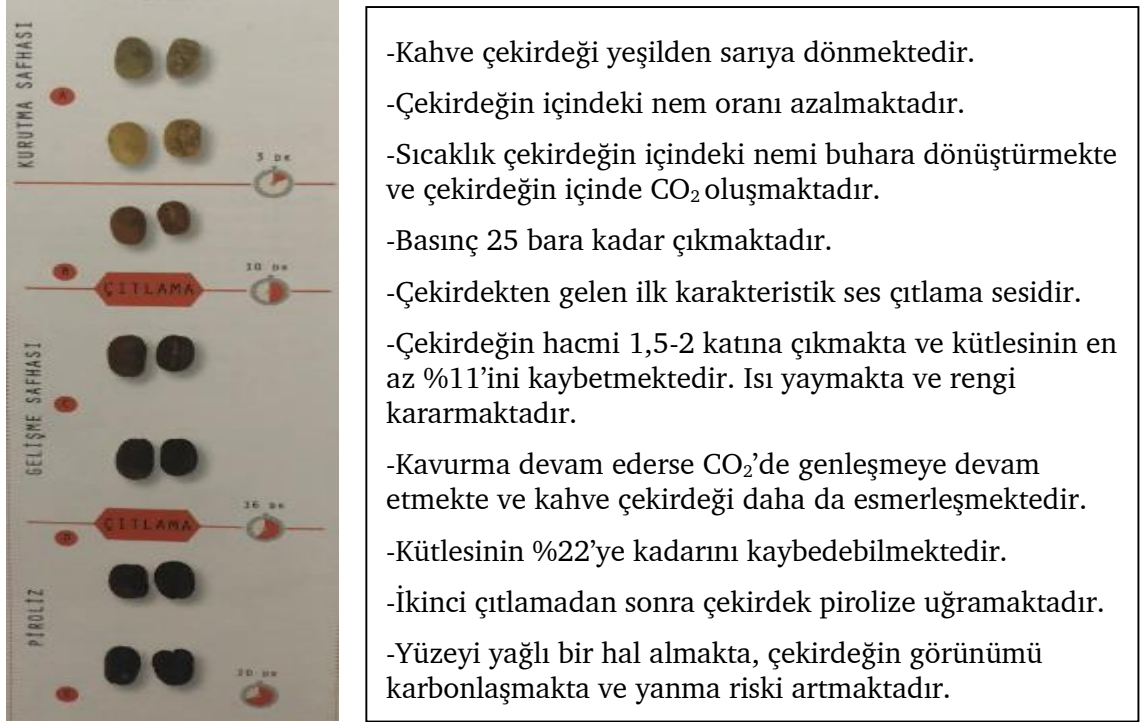
Günümüzde farklı kavurma cihazları (ev tipi kurutma, endüstriyel kurutma) kahve çekirdeğinin kavrulması amacıyla kullanılmaktadır ve en yaygın olarak kullanılan kavurucu Şekil 1.8’de gösterilen direkt olarak gazla ısıtılan dönen silindirik tamburu olan fırındır. Bu tip makinayla yapılan kavurma, 190’dan 230°C’lere çıkan sıcaklıklarda 10-20 dakika sürmektedir (Racineux ve Tran, 2018).



Şekil 1.8 Kahve kavurucu

Kahve yüksek derecelerde kavrulup rengi koyulaştıkça kavurma işleminden kaynaklanan aromalar ön plana çıkmaktadır. Kahve kavrulurken kademeli olarak iki farklı çıtlama (cracking) sürecinden geçmektedir. Yaklaşık 196°C’de yeşil kahve taneleri çıtlama sesi çıkartmaktadır. “İlk çıtlama” adı verilen bu aşama kahvenin

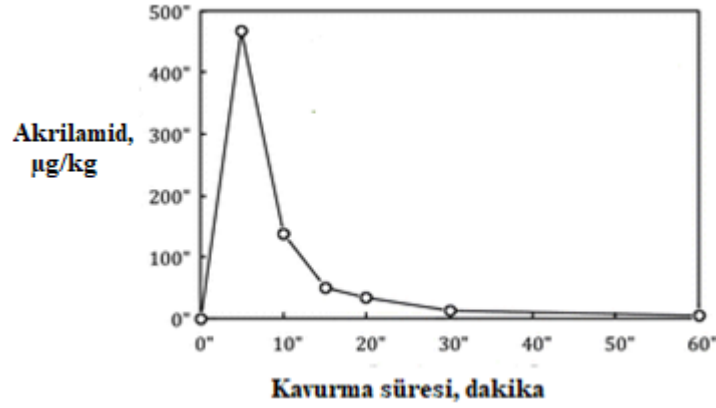
hafif kavrulmasının başlangıcıdır. İlk çıtlama ile kahvenin nemi büyük oranda buharlaşmakta ve çekirdekleri büyümektedir. Kahve 224°C'ye ulaşınca "ikinci çıtlama" aşaması başlamakta ve kahve çekirdekleri zamanla çökmektedir. Bu aşamadan sonra kavurma devam ederse kahve kömürleşmektedir (Şekil 1.9) (Racineux ve Tran, 2018).



Şekil 1.9 Kahve kavurma aşamalarında oluşan değişimler

Kahve çekirdekleri diğer gıda maddelerine oranla daha yüksek sıcaklıklara maruz kalmaktadır. Bu nedenle, kahvede Maillard reaksiyonun yanında başka yollarda (sükroz ayrışması, 3-APA ve lipid oksidasyonu gibi) akrilamid oluşumuna neden olmaktadır (Bagdonaite vd., 2008; Kocadağlı vd., 2012; Stadler ve Scholz, 2014). Kahvede akrilamid oluşumunda görev alan temel öncü maddelerin sükroz ve asparajin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, yeşil kahve çekirdeğindeki asparajin miktarının kahvede akrilamid oluşumunda sınırlayıcı faktör olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Preedy, 2014). Yeşil kahvede asparajin konsantrasyonu 30-90 mg/100 g aralığında değişmektedir. Robusta kahvelerin asparajin miktarı Arabica kahvelere oranla daha yüksektir ve Robusta kahvelerde akrilamid miktarı genellikle daha yüksek bulunmaktadır. Orta kavrulmuş Arabica kahvelerde ortalama akrilamid miktarının 230 µg/kg, Robusta kahvelerde ise 500

$\mu\text{g/kg}$ civarında olduğu saptanmıştır (Alves vd., 2010). Kavurma süresi ve hızı, kahvenin aroma, lezzet ve renk gibi fiziksel özelliklerini ve akrilamid miktarını etkilemektedir. Şekil 1.10'da gösterildiği üzere kahvede akrilamid miktarı, kavurma işleminin başında $500 \mu\text{g/kg}$ seviyelerine ulaşmaktadır ancak kavurmanın ilerleyen aşamalarında akrilamid degrade olmaya başlamaktadır (Zhang ve Zhang, 2007).



Şekil 1.10 Kavurma süresinin kahvelerin akrilamid miktarına etkisi (Kocadağlı vd., 2012)

Kahve tüketiminin pozitif etkilerinin yanında negatif etkilerinin de olması biyoaktif maddeler yönünden zengin ve sağlık açısından yararlı kahveye alternatif ürünlerin arayışına girilmesine neden olmuştur (Pourshahidi, 2016). Kahve olmayan ve kahvenin yerine kullanılan kafeinsiz ürünlere kahve ikamesi denilmektedir. Tahıl bazlı kahve ikamelerinin %60-70'ı genelde kavurulmuş arpa ve çavdar kullanılarak üretilmektedir. Hindiba (%15-20) ve şeker pancarı (%6-10) ise kahve ikamelerinde yaygın olarak kullanılan diğer maddelerdir (Samsonowicz, 2019). Ülkemizde de "*Pistacia terebinthus*" ağacının meyvesinin kavrulmasıyla elde edilen menengiç kahvesi, kahve ikamesi olarak tüketilen ürünlerden birisidir. Mojska ve Gielecinska (2013) tahıl bazlı kahve ikamelerinin yüksek oranda (ortalama $818 \mu\text{g/kg}$) akrilamid içerdiğini saptamışlardır.

1.1.5.2 Patates

Kızartılmış patates ürünleri şimdiye kadar tespit edilen en yüksek akrilamid seviyesine ($30-3230 \mu\text{g/kg}$) sahip olan gıda gruplarıdır (Pedreschi vd., 2004). Çiğ patates, akrilamid oluşumunda öncü olan maddeleri (serbest asparajin, glikoz,

fruktoz) yüksek seviyede içermektedir. Asparajın patatesten en fazla miktarda (2010-4250 mg/kg) bulunan serbest aminoasittir ve yüksek sıcaklıkta Maillard reaksiyonu aracılığıyla akrilamid oluşumunda görev almaktadır (Martin ve Ames, 2001). Patateslerin asparajın içeriği çeşit, lokasyon, gübreleme, işleme ve depolama gibi faktörlerden etkilenmektedir. Akrilamid oluşumu patatesin şeker miktarıyla da bağlantılıdır ve çiğ patates indirgen şeker (glikoz+fruktoz) yönünden (97-2550 mg/kg) zengin bir gıdadır (Mulla vd., 2011).

Yapılan çeşitli araştırmalarda çiğ patatesin glikoz, fruktoz ve asparajın miktarı ile akrilamid oluşumu arasında pozitif, fenolik bileşikler ile akrilamid oluşumu arasında negatif korelasyonlar saptanmıştır (Zhu vd., 2010). Bu nedenle, akrilamid oluşumunun azaltılması için düşük konsantrasyonda fruktoz, glikoz, asparajın ve yüksek düzeyde fenolik madde içeren patates çeşitlerinin tercih edilmesi önerilmektedir (Alpözen, 2012).

Powers vd. (2013), 20 Avrupa ülkesinde 2002 ve 2011 yılları arasında 40,455 taze patates cipsi örneğinde akrilamid taraması yapmışlardır. 2002 yılında örneklerdeki ortalama seviyesinin $763,0 \pm 91,1 \mu\text{g/kg}$ olduğunu, 2011 yılına gelindiğinde ise bu değerin düşerek $358,0 \pm 2,5 \mu\text{g/kg}$ rakamına ulaştığını belirlemişlerdir.

Razia vd. (2016), Pakistan'da yaygın olarak tüketilen patates cipsi markalarının akrilamid miktarını incelemişler ve cipslerin akrilamid seviyelerinin $27,1 \pm 0,65$ ile $1323,0 \pm 3,0 \mu\text{g/kg}$ arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Hasat edildikten sonra 2°C ve 20°C'de depo edilen patateslerden cipsler yapılmış ve bu ürünlerdeki akrilamid miktarı GC'de analiz edilmiş, 2°C'de depolanan patateslerden yapılan cipslerin akrilamid seviyesinin 20°C'de depolanan patateslere göre 10 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca, cipsin akrilamid miktarı ile çiğ patatesin glikoz ve fruktoz seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Chuda vd., 2003).

1.1.5.3 Tahıl Ürünleri

Tahıl ürünleri geniş bir ürün yelpazesini kapsamaktadır. Ekmek, bisküvi, kahvaltılık gevrekler ve tahıl bazlı bebek mamaları bu ürünlerden bazılarıdır.

Formülasyonlardaki ve teknolojilerdeki farklılıklardan dolayı, tahıl ürünlerinin akrilamid miktarı değişkenlik göstermektedir (Stadler ve Scholz, 2004). JECFA (2005) raporunda, ortalama akrilamid seviyesinin ekmeklerde 446 $\mu\text{g/kg}$, bisküvilerde 350 $\mu\text{g/kg}$, kahvaltılık gevreklerde 96 $\mu\text{g/kg}$ ve pizza'da 33 $\mu\text{g/kg}$ olduğu bildirilmiştir.

Unlu mamüllerdeki karbonhidrat akrilamid oluşumunda önemli rol oynasa da sınırlayıcı faktörün asparajin miktarı olduğu bulunmuştur (Surdyk vd., 2004). Vass vd. (2004) buğday krakerindeki indirgen şeker şurubu yerine sükroz ekleyince akrilamid seviyesinde %60 oranında azalma saptamışlardır. Benzer etkiler zencefilli kekta yapılan bir çalışmada da gözlemlenmiştir (Amrein vd., 2004). Bu durumun nedeni, Maillard reaksiyonunda görev alan reaktif karbonillerin (glikoz ve fruktoz'dan gelen) yetersiz hale gelmesi olarak görülmektedir.

1.1.5.4 Kurutulmuş Meyveler ve Yenilebilir Tohumlar

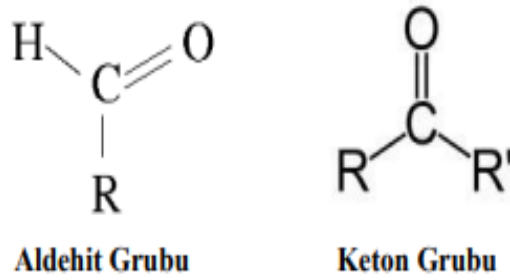
Kuru erik ve fıstıkların akrilamid seviyesini belirlemek üzerine bir çalışma yapılmış ve akrilamidin kuru erikte 14,7-124,3 $\mu\text{g/kg}$ ve fıstıkta 10,0-42,9 $\mu\text{g/kg}$ aralığında değiştiği saptanmıştır (De Paola vd., 2017). Kuru erik, yaş eriğin 70-80°C'de 24-36 saat boyunca kurutulmasıyla elde edilmektedir. Nispeten düşük sıcaklık (<120°C) uygulanmasına rağmen bu ürünlerde akrilamid tespit edilmesi, bazı yolların düşük sıcaklıkta da akrilamid oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kurutma işleminin üründeki şeker ve asparajin konsantrasyonunu artırması akrilamid oluşumunu teşvik etmektedir (Amrein vd., 2007). Ölmez vd. (2008) kavrulmuş bademlerde 207-313 $\mu\text{g/kg}$ arasında değişen bir akrilamid konsantrasyonu tespit etmişlerdir. Bu durumun nedeni, bademin yüksek oranda asparajin (2000-3000 mg/kg), indirgen şeker (500-1300 mg/kg) ve sükroz (2500-5300 mg/kg) içermesi olarak açıklanmaktadır (Alpözen, 2012). Amrein vd. (2003) kurutulmuş kayısı ve kurutulmuş muzun sırasıyla ortalama 180 mg/kg ve 50 mg/kg akrilamid içerdiğini bildirmişlerdir.

1.1.6 Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıdanın kompozisyonu ve fiziko-kimyasal özellikleri (indirgen şekerler, amino asitler, yağlar, protein, pH ve nem), işleme koşulları (sıcaklık ve zaman), agronomik ve genetik faktörler gıdalardaki akrilamid oluşumunu etkilemektedir (Claeys vd., 2005; Friedman ve Levin, 2008).

1.1.6.1 İndirgen Şekerler

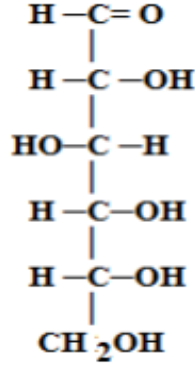
Şekil 1.11’de gösterildiği üzere indirgen şekerler (glikoz, fruktoz, maltoz, laktoz ve arabinoz gibi), serbest aldehit veya serbest keton grubuna sahip olan indirgeyici madde (diğer moleküle elektron verebilen) olarak işlev görebilecek moleküllerdir (Bener vd., 2018). Oksijen ve diğer oksidan maddelerle kolayca okside olmaktadır. Bu nedenle, alkali çözeltilerdeki indirgen şekerler; gümüş, civa ve bakır gibi okside edici metal iyonlarını indirgeyebilmektedirler. Ketonlar, aldolara göre daha zor tepkimeye girmektedirler.



Şekil 1.11 Aldehit ve keton gruplarının formülü

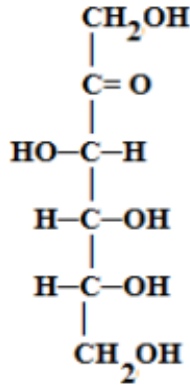
Karbonhidratlar basit (monosakkaritler: glikoz, fruktoz, galaktoz) ve bileşik karbonhidratlar (polisakkaritler: homopolisakkaritler, heteropolisakkaritler, glikojen, selüloz) olarak sınıflandırılmaktadır (Anonim, 2013).

Glikoz- Kapalı formülü $C_6H_{12}O_6$ ’dır ve kompleks karbonhidratların bileşiminde en fazla bulunan monosakkarittir (Şekil 1.12). Molekül yapısında aldehit grubu olduğu için aldoheksozdur.



Şekil 1.12 D-glikozun zincir yapısı

Fruktoz-Kapalı formülü glikoz ile aynıdır ve ketoheksozdur (Şekil 1.13). Çoğunlukla glikoz ve sükrozla beraber bulunmaktadır.



Şekil 1.13 Fruktozun zincir yapısı

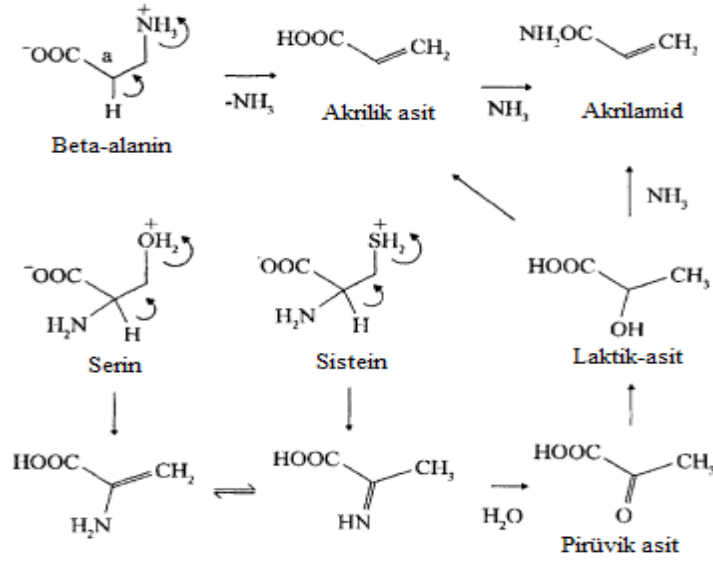
Sükroz, laktoz, maltoz ve nişasta gibi şekerler 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda asidik pH'da kolay bir şekilde monosakkaritlere hidrolize olmaktadır. Termal işlem kompleks karbonhidratlardan monosakkaritlerin sürekli bir şekilde oluşmasına neden olmaktadır (Lingnert vd., 2002). Zyzak vd. (2003) çeşitli monosakkaritlerin (örneğin glikoz, deoksiglikoz, riboz, gliseraldehit, glisokal) asparajin ile akrilamid oluşturduğunu saptamışlardır. Ayrıca şeker zinciri kısaldıkça akrilamid oluşumunun arttığı belirlenmiştir. Şeker zinciri kısaldıkça, molekül halkalı bir hemiasetal yapı oluşturmak için şekil değiştirmekte ve karbonil, asparajinin α-aminiyle nükleofilik atak için daha kolay erişilebilir hale gelmektedir (Claeys vd., 2005).

Kahve gibi indirgen şeker seviyesi düşük gıdalarda da akrilamid oluştuğu gözlemlenmiştir (Alves vd., 2010). Yapılan çalışmalarda, kahvede akrilamid oluşumunu tetikleyen karbonil kaynaklarından birinin indirgen olmayan bir şeker olan sükroz olduğu belirlenmiştir. Kocadağlı vd. (2012) yeşil kahve çekirdeklerinin 220°C'de kavrulmasıyla tüm sükrozun 15 dakika içinde parçalandığını ve karbonil havuzu oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

1.1.6.2 Amino Asitler

Asparajin üzerinden direkt olarak akrilamid oluşumu olabilen tek aminoasittir. Bu nedenle, gıdalarda akrilamidin temel kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yapılan kapsamlı çalışmalar, şeker ve diğer karbonil bileşiklerin akrilamid oluşumunda gerekli bir basamak olan asparajin dekarboksilasyonunda rol oynadığını göstermektedir. Asparajin ve şeker arasında oluşan Schiff bazı, Amadori ürününün dekarboksilasyonu için düşük enerji alternatifi sunmaktadır (Manini vd., 2001). Bazı amino asitler, termal ayrışma sırasında doğrudan akrilik asit üretebilmektedirler. Bu tür amino asitler, akrilik asidi akrilamide dönüştürmek için amonyağa ihtiyaç duymaktadırlar.

Gıdadaki temel amonyak kaynaklarından biri serbest amino asitlerdir (Yaylayan vd., 2005). Sohn ve Ho (1995), ısı işlem altında en verimli amonyak üreten amino asit olarak asparajin, glutamin, sistein ve aspartik asidi tanımlamıştır. Tek başına β -alanin'in deaminasyonu, akrilik asit ve akrilamid oluşturabilmektedir. Oluşan asit ortamdaki amonyak ile akrilamid oluşturmak için birleşmektedir. Aspartik asitten, akrilik asit ve akabinde akrilamid oluşabilmektedir. Ancak β -alaninden farklı olarak glikoz varlığında aspartik asitten daha fazla akrilik asit üretilmektedir. Sistein amino asidi ise hidrojen disülfid molekülünü kaybederek akrilik asit oluşturabilmektedir (Şekil 1.14) (Stadler vd., 2003; Yaylayan, 2005).



Şekil 1.14 Beta-alanin, serin ve sistein üzerinden akrilamid oluşum mekanizması

Patateste asparajın toplam aminoasidin %40'ını, unda %14'ünü ve çavdarda %18'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, eşit molarda asparajın/glikoz içeren ortamın akrilamid oluşumu için en ideal olduğu saptanmıştır (Claeys vd., 2005). Amino asitler ısıtılma işlem gören gıdalarda akrilamid oluşumunda önemli rol oynasa da patates yumrusundaki asparajın ya da amino asit içeriği ile akrilamid oluşumu arasında önemli bir korelasyon bulunamamıştır (Amrein vd., 2003). Bununla birlikte, buğday ve çavdar ununda akrilamid oluşumu ve asparajın seviyesi arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (Surdyk vd., 2004).

1.1.6.3 Protein veya Karbonhidrat Yönünden Zengin Gıdalar

Kızartılmış et ve balık ürünlerinin, patates ve tahıl ürünlerine oranla daha düşük miktarda akrilamid içerdiği çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (Tareke, 2003). Gıda matriksinin, akrilamid oluşumu üzerinde çeşitli etkileri (artırma, azaltma ya da nötr) olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, buğday ununun ve mısır nişastasının asparajın seviyesi patatesteki konsantrasyona denk olacak şekilde zenginleştirildiğinde ürünlerde oluşan akrilamid miktarının yine de patatestekinin 5'te 1'i seviyesinde olduğu görülmüştür. Claeys vd. (2005) akrilamid oluşum ve eliminasyon derecesinin nişastada daha düşük olduğunu, Biedermann vd. (2002) ise sığır eti sisteminde akrilamid degradasyonunun daha yüksek olduğunu

saptamıştır. Bu durum, akrilamid oluşumunu değerlendirirken eliminasyon mekanizmalarını da göz önünde bulundurmak gerektiğini göstermektedir.

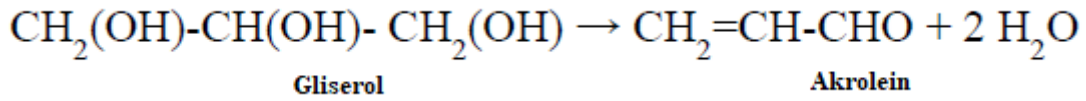
1.1.6.4 Yağlar

Yağların ve karbonhidratların kimyasal yapıları birbirinden farklı olsa da lipid oksidasyon ürünleri de indirgen şekerler gibi karbonil bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu karbonil bileşikler serbest asparajin ile birleşip akrilamid oluşturabilmektedir (Bakhtiary vd., 2013). Capuano vd. (2010) doymuş yağ içeren ürünlerin termal oksidasyona daha az yatkınlık gösterdiğini ve bu ürünlerde daha az akrilamid oluştuğunu tespit etmişlerdir. Yağların termo-oksidatif stabilitesi; yağ asidi kompozisyonunun değiştirilmesi ve antioksidan maddelerin eklenmesi ile geliştirilebilir. Ayrıca, yağ asidi kompozisyonu ve yağların fonksiyonel özellikleri hidrojenasyon, interesterifikasyon ve farklı türdeki yağların harmanlanması ile değiştirilebilir (Chu ve Kung, 1998).

Ehling vd. (2005) yağların doymamışlık seviyesine bağlı olarak asparajinle farklı miktarlarda akrilamid oluşturduklarını saptamışlardır (sardalya yağı (642,0 $\mu\text{g/g}$ asparajin) > morina karaciğeri yağı (435,4 $\mu\text{g/g}$) > soya fasulyesi yağı (135,8 $\mu\text{g/g}$) > mısır yağı (80,7 $\mu\text{g/g}$) > zeytinyağı (73,6 $\mu\text{g/g}$) > kanola yağı (70,7 $\mu\text{g/g}$) > mısır yağı (62,1 $\mu\text{g/g}$) > sığır yağı (59,3 $\mu\text{g/g}$) > domuz yağı (36,0 $\mu\text{g/g}$)).

Akrilamid oluşumunda görev alan akrolein, gliserol üzerinden veya çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşabilmektedir. Yağ, dumanlama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda ısıtılırsa gliserol akroleine parçalanmaktadır (Şekil 1.15). Dumanlama noktası; yağı bozmadan kaç derece sıcaklığa kadar kullanabileceğimizi göstermektedir. Katı ve sıvı yağların kararlılığını etkileyen diğer önemli faktör yağ asidi profilidir (doymuş yağ asidi, tekli doymamış yağ asidi ve çoklu doymamış yağ asidi). Doyma oranı ne derece yüksekse yağ o denli kararlı olmakta ve oksidize olmamaktadır. Yüksek doymuş yağ asidi ve düşük çoklu doymamış yağ asidi profili içeren yağların dumanlama noktasının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Palm yağı, zeytinyağı, hindistan cevizi yağı, ayçiçek yağı, mısır yağı, margarin ve tereyağının dumanlama noktaları

sırasıyla 220°C, 210°C, 180°C, 170°C, 160°C, 150°C ve 110°C'dir (Muchtaridi vd., 2012).



Şekil 1.15 Gliserolden akrolein oluşumu (Alpözen, 2012).

Bakhtiary vd. (2013) patatesleri kızartmak için kullanılan yağın çeşidinin akrilamid oluşumuna olan etkilerini incelemişlerdir. Palm olein yağıyla, susam yağıyla ya da bunların karışımı (50:50, v/v) ile kızartılan patateslerde sırasıyla 1140 ppb, 860 ppb ve 952 ppb seviyesinde akrilamid oluştuğunu saptamışlar. Bu durumun altında yatan nedeni susam yağının termo-oksidatif stabilitesinin diğer denenen yağlardan daha yüksek olması olarak açıklamışlardır.

Gertz ve Klostermann (2002) palm olein yağında kızartılan patateslerin akrilamid seviyesinin ayçiçek ve kanola yağında kızartılanlara göre çok daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Palm olein yağının yüksek miktarda diasilgliserol (%8,0) ve monoasilgliserol (%0,3-0,5) içermesinin bu durumun nedeni olduğu düşünülmektedir.

1.1.6.5 Gıdanın pH'ı

Akrilamid oluşumu, Maillard reaksiyonu gibi sistemin pH'ından etkilenmektedir. pH, hem şekerin hem de amino gruplarının reaktivitesini etkilemektedir. Yüksek pH, şekerin açık zincir formunu ve amino grubun protonlanmamış formunu reaktif formlar olarak desteklemektedir. Akrilamid oluşumu için optimum pH 7-8 civarındadır. Asparajin ve glikoz içeren model çalışmalarda pH'ın 7'den 4'e düşürülmesiyle akrilamidin ciddi oranda düştüğü saptanmıştır (Brown, 2003; Jung vd., 2003).

1.1.6.6 Gıdanın Nemi

Akrilamid oluşumu temel olarak bir yüzey olayı gibi görülmektedir. Sınırlı oranda kabuk oluşumu olan ürünlerde akrilamid seviyesinin düşük olduğu görülmüştür. Maillard reaksiyonunun nem oranının %12-18 olduğu ortamlarda en verimli olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, düşük nem oranlarında sadece akrilamid

oluşumu değil eliminasyonu da hızlanmaktadır. Bu durum, akrilamid seviyesinin sabit miktarlarda kalmasını sağlamaktadır (Eichner ve Karel, 1972).

1.1.6.7 Agronomik Faktörler

Sülfat eksikliği koşullarında yetişen buğdayın asparajin seviyelerinin, yeterli miktarda sülfat içeren topraklarda yetiştirilen göre 30 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (Muttucumaru vd., 2006). Bu durum, unlu mamüllerde saptanan akrilamid seviyelerine de yansımaktadır. Yüksek asparajin içeren buğday unu ile hazırlanan ürünlerde akrilamid seviyesinin 2600-5200 µg/kg, normal koşullarda yetiştirilen buğday unu ile hazırlanan ürünlerin akrilamid seviyesinin 600-900 µg/kg arasında değiştiği saptanmıştır.

Ekmeğin akrilamid seviyesi genellikle hamuru hazırlamak için kullanılan buğdayın çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Akrilamid öncü maddelerinin (asparajin, indirgen şekerler gibi) seviyelerini tahıl ve patates bitkilerinde azaltmak için toprak verimliliği, agronomik ve genetik yaklaşımlar aktif olarak araştırılan alanlardır (Friedman ve Levin, 2008).

1.1.7 Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Azaltma Stratejileri

Gıdalarda akrilamid oluşumu azaltmak için genel olarak 3 strateji üzerinde durulmaktadır (Pal Murugan vd., 2016):

- *Uygun hammaddenin seçilmesi,
- *Ürünün formülasyonu ya da boyutunun değiştirilmesi,
- *Bazı ön işlemlerin uygulanması ve proses parametrelerinin değiştirilmesi,

1.1.7.1 Uygun Hammadde Seçimi

Yüksek miktarda asparajin (2010-4250 mg/kg) içeren patatesten, indirgen şeker konsantrasyonu (97-2550 mg/kg) akrilamid oluşumunda sınırlayıcı faktör olarak görülmektedir. Akrilamid öncü maddelerinin konsantrasyonu ise patatesin çeşidinden, tarım ve depolama koşullarından etkilenmektedir (Pal Murugan vd., 2016). Shojee-Aliabadi vd. (2013) yaptığı çalışmada Sante çeşidi patatesin Salava çeşidine göre daha yüksek miktarda indirgen şeker içerdiğini ve Sante çeşidinden

yapılan patates cipslerde yüksek miktarda (8825 $\mu\text{g/kg}$) akrilamid oluştuğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, düşük seviyede akrilamid içeren patates cipsi üretiminde uygun çeşidin seçiminin önemli olduğu saptanmıştır. Friedman (2003) 1 kg'da maksimum 1 g indirgen şeker içeren patatesin seçilmesinin akrilamid azaltımında önemli bir yöntem olduğunu belirtmiştir.

Gübre kullanımının ve ürünün yetiştirildiği çevrenin özelliklerinin mahsüllerin asparajin ve şeker seviyeleri üzerinde farklı etkileri olabilmektedir. Sülfür yönünden eksik ortamda yetişen buğdayların serbest asparajin seviyesinin daha yüksek olduğu ve akrilamid oluşum riskini artırdığı saptanmıştır (Curtis vd., 2009). Benzer şekilde, Lerner vd. (2006) nitrojen (azot) yönünden zengin gübre ile yetiştirilen buğdayların asparajin seviyelerinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Asparajin, bitkisel ürünlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir amino asittir. Bitki nitrojeni protein formunda depolayamazsa serbest asparajin olarak depolamayı tercih etmektedir (Lea vd., 2007). Elmore vd. (2007) sülfür eksikliğinin patates yumrularının şeker seviyesinde artışa sebep olduğu ama ilginç bir şekilde yumrudan elde edilen ürünlerin akrilamid seviyesinde azalma olduğunu belirlemişlerdir. Whittaker vd. (2010) ekim yapılan toprağın özelliklerinin yumrunun mineral içeriğini etkilediğini ve indirgen şeker içeriği ile potasyum ve kalsiyum seviyeleri arasında negatif, demir ve bakır seviyeleri arasında pozitif korelasyonlar olduğunu bulmuşlardır.

Tarım ürünlerinin olgunluk seviyesinin ürünün indirgen şeker ve asparajin miktarını etkilediğini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır. Örneğin, erken hasat edilen patates yumrularının indirgen şeker (glikoz, fruktoz) miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Seal vd., 2008). Bu nedenle, geç hasat (olgun) patates yumrularının kullanılması bir başka akrilamid azaltma stratejisidir. Taze ürünlerin, depolama koşullarının da akrilamid oluşumu üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir. Yumrulu bitkiler, 8°C'den düşük bir sıcaklıkta depolandığı zaman üründe indirgen şeker akümüasyonu oluştuğu görülmüştür. Bu nedenle, yumrulu bitkilerin depolama sıcaklığının belli bir derecede (15°C gibi) korunması bir başka akrilamid oluşumunu önleme yöntemidir (Viklund vd., 2010).

1.1.7.2 Ürün Formülasyonu ya da Boyutunun Değiştirilmesi

Ürünün formülasyonu ve kompozisyonunun akrilamid oluşumu üzerinde önemli etkileri bulunduğu bilinmektedir. Bazı bileşiklerin eklenmesi veya uzaklaştırılmasının son ürünün akrilamid seviyesini etkilediğini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır. Gökmen vd. (2007) kurabiye hamurunun şeker oranı arttıkça akrilamid oluşumunun arttığını ancak indirgen şeker yerine sükroz eklendiği zaman akrilamid oluşumunun azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, sükroz içeren kurabiye formülasyonuna sitrik asit eklendiği zaman akrilamid oluşum yatkınlığının arttığını saptamışlardır. Bir başka çalışmada, zencefilli keke farklı baharatlar (karanfil, tarçın, yenibahar, beyaz biber, anason, yıldız anason, kişniş, rezene, hindistan cevizi, kakule, vanilya ve zencefil) eklemenin akrilamid oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre, hindistan cevizi, rezene, anason veya karanfil ilavesi ile zencefilli kekin akrilamid içeriğinde %23'e varan bir azalma görülmüştür. Baharatların serbest radikalleri temizleme aktivitesinin yüksek olması bu sonucun nedeni olarak öne sürülmüştür. Öte yandan, tarçın ve kişniş eklenen kek formülasyonunun akrilamid seviyesinde %29'a varan artış saptanmıştır. Bu baharatlarda bulunan sinamik asit ve türevleri gibi bileşiklerin akrilamid oluşumunu destekleyici etki gösterdiği düşünülmektedir (Marková vd., 2012).

Barutcu vd. (2009) farklı un çeşitlerini (soya, nohut ve pirinç unu) kullanarak tavuk harcı hazırlamış ve bu harca bulunan tavukları mikrodalgada ya da fritözde kızartıp akrilamid oluşumunu incelemişlerdir. Farklı un karışımlarına bulunan kızartılmış tavukların akrilamid seviyesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Kururova vd. (2009) tahıl matriksinde inorganik tuz (tek değerli ve iki değerli klorürler, hidrojen karbonatlar, fosfatlar ve laktat) kullanmanın akrilamid oluşumuna etkilerini incelemiştir. Amonyum hidrojen karbonatın (NH_4HCO_3) akrilamid oluşumunu önemli derecede arttırdığı ancak diğer organik tuzların akrilamid miktarını azalttığı görülmüştür. Kalsiyum klorürün (CaCl_2) %90'a varan seviyelerde akrilamid azaltımı sağlayabildiği bilinmektedir. Tuz içermeyen tahıl model sistemi 190°C 'de 9 dakika fırınlandığında $603 \pm 29 \mu\text{g/kg}$ seviyesinde

akrilamid oluştuğu tespit edilirken sodyum klorür (NaCl) ve potasyum klorür (KCl) kullanılan sistemde akrilamidin $345 \pm 19 \mu\text{g/kg}$ seviyesine düştüğu belirlenmiştir. Akrilamid miktarındaki azalmanın nedeni, tuzun asparajin ve indirgen şeker arasında Schiff bazı oluşmasını inhibe etmesiyle açıklanmaktadır (Gökmen ve şenyuva, 2007).

Patates kızartmasında akrilamid ürünün yüzeyinde oluşmaktadır. Bu nedenle, dilimleme şekli (yüzey hacim oranı) ve boyutu son ürünlerdeki akrilamid oranını etkilemektedir. İnce kesilmiş bir patatesin istenen nem oranına ulaşması için aynı kızartma süresinde daha az sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır ve dolayısıyla daha düşük konsantrasyonda akrilamid oluşmaktadır (Pal Murugan vd., 2016).

1.1.7.3 Ön İşlemler Uygulamak ve Proses Parametrelerini Değiştirmek

Gıdalara uygulanan ön işlemlerin temel amacı akrilamid öncü maddelerinin konsantrasyonunu azaltarak Maillard reaksiyonunun oluşmasını minimize etmektir. Suda bekletme, haşlama, antioksidan ve doğal ekstrakt eklemek bu uygulamalardan bazılarıdır. Patatesteki indirgen şeker seviyesi doğranmış patateslerin suda bekletilmesi ile azalmaktadır. Dolayısıyla, distile suda ya da sulu solüsyonda bekletildikten sonra kızartılan patateslerin akrilamid seviyesi daha düşük olmaktadır. Kita vd. (2004) çiğ patates dilimlerini 20°C'lik farklı daldırma solüsyonlarında (su, sitrik asit ve asetik asit) 60 dakika beklettikten sonra 175°C'lik palm yağında 4 dakika kızartmıştır. Su, sitrik asit ve asetik asit solüsyonlarına daldırıldıktan sonra patates kızartmalarında %10, %31 ve %43 oranında akrilamid azaltımı sağlandığı görülmüştür.

Pedreschi vd. (2004) distile suda 90 dakika bekletilen patates dilimlerinin glikoz seviyesinin %32 oranında azaldığını ve farklı sürelerde (40 ve 90 dakika) suda bekletilip kızartılan patateslerde akrilamid konsantrasyonunun kontrole göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Haşlama akrilamid öncü maddelerini azaltmak için kullanılan bir başka ön işlemdir. Viklund vd. (2010) 80°C'lik suda 3 dakika haşlandıktan sonra kızartılan farklı çeşit patateslerde akrilamid seviyesinin %51-73 seviyesinde düştüğünü

saptamışlardır. Haşlama işleminin, patatesten bulunan akrilamid öncü maddelerinin (asparajin ve indirgen şeker) miktarını azalttığını belirlemişlerdir.

Fermentasyon işleminin ürünün akrilamid miktarını azaltmak için kullanıldığı çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır. Laktik asit fermentasyonu (*Lactobacillus plantarum*) (120 dak.) uygulanan patates dilimleri kızartıldığında akrilamid oluşumunun %71 oranında azaldığı saptanmıştır. *L. plantarum*'un çiğ patatesin indirgen şeker seviyesini azaltması bu durumun nedeni olarak belirlenmiştir. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin ürünlerdeki indirgen şekeri laktik aside dönüştürmesi ve akabinde gıda matriksinin pH değerinin düşmesi bu azalmanın bir başka destekçisi olarak görülmektedir (Baardseth vd., 2006). Nasiri Esfahani vd. (2017) uygun *Lactobacillus* suşunu (*L. rhamnosus*) maya ile birleştiren, sadece maya kullanılarak üretilen tam-buğday ekmeğine göre daha az akrilamid oluştuğunu saptamışlardır.

Genel olarak Maillard reaksiyonunu etkileyen parametrelerde değişiklik yapılarak gıdadaki akrilamid oluşumunu azaltılabilmektedir. Sıcaklık, süre ve su aktivitesi (a_w) değerlerinin ayarlanması, enzim eklenmesi ya da ideal yağ çeşidinin kullanılması akrilamid azaltımı elde etmek için üzerinde çalışma yapılan konulardan bazılarıdır (Lingnert vd., 2002).

Amrein vd. (2006) patates matriksindeki nem miktarını %20'nin altına düşürmenin akrilamid oluşumundaki aktivasyon enerjisini artırdığını ve dolayısıyla akrilamid oluşumunu azalttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, kızartma süresi uzadıkça patatesin akrilamid seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir.

Cieasrova vd. (2006) gıdanın neminin ve fiziksel formunun akrilamid oluşum mekanizmasını etkilediğini belirlemişlerdir çünkü izlenen kimyasal yollar ve moleküler hareketlilik ürünün su içeriğinden etkilenmektedir.

Pedreschi vd. (2004) kızartma yağının sıcaklığının 190°C'den 150°C'ye indirilmesiyle akrilamid oluşumunun azaldığını bulmuşlardır.

Becalski vd. (2003) zeytinyağının, akrilamid oluşumunda diğer ticari yağlardan farklı bir karaktere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Zeytinyağı kullanılarak kızartılan patates cipslerinin daha çok akrilamid içerdiğini tespit etmişlerdir.

Gökmen vd. (2006) bir çalışmada sıcaklık ve sürenin patates kızartmalarında akrilamid olumunu etkileyen iki önemli faktör olduğunu belirlemişlerdir. Isı transferine ve suyun buharlaşmasına karşı gösterilen direnç üründe sıcaklık dağılımı oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, ürünün yüzeyinde ve merkezinde oluşan akrilamid miktarının eşit olmadığı, 190°C’de 3 dakika kızartılan patateslerin akrilamid miktarının 150°C’de 9 dakika kızartılan patateslere göre 40 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Fırınlama sıcaklığının azaltılması, ürünün akrilamid miktarının düşürülmesine yardımcı olabilmektedir. Örneğin, az pişirilen bisküvilerde akrilamid seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Öte yandan, bazı fırıncılık ürünlerinde fazla pişirmenin akrilamid azaltımı sağladığı saptanmıştır. Bunun, yüksek sıcaklıklarda akrilamid oluşumu ve yıkımı arasındaki dengeden kaynaklandığına inanılmaktadır. Tüm bu çalışmaların sonucunda gıdalardaki akrilamid miktarının tamamen sıfırlanmasa da belli bir seviyenin altına düşürülebildiği görülmüştür (Stojanovska ve Tomovska, 2015).

Gıdalarda akrilamid azaltma yöntemlerinden birisi de asparaginaz enzimi kullanımıdır. Mikroorganizmalar (**bakteri:** *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus*, *Acinetobacter calcoeticus*, *Proteus vulgaris*, **maya:** *Saccharomyces cerevisiae* ya da **küf:** *Aspergillus tamari*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* spp. ve *Fusarium* spp.) aracılığıyla üretilen bu enzim üründeki asparajin amino asidini aspartik asit ve amonyağa hidrolize etmektedir (Şekil 1. 16) (Arima vd., 1972). Dolayısıyla, ortamda akrilamid oluşturabilecek sınırlı miktarda asparajin kalmakta ve akrilamid seviyesi düşmektedir. Bu enzim, daha düşük hızda da olsa glutamin molekülünden amino grubunu ayırabilmektedir. Duyusal olarak üründe önemli bir değişiklik yapmaması ve nispeten uygulamasının kolay olması asparaginaz enzimiyle akrilamid azaltımı yapmayı nispeten avantajlı hale getirmektedir (Batoool vd., 2016).

Yeşil Kahve Çekirdeklerinin Temin Edilmesi: Kahve çekirdekleri, subtropikal bölgede yetişen kahve ağacının meyveleridir. Arabica, Robusta ya da bunların karışımı bu uygulama için kullanılabilir.

Kahve Çekirdeklerine Ön İşlem Uygulanması: Enzim eklemenden önce yeşil kahve çekirdeklerine ön işlem uygulanabilmektedir. Bu ön işlemlerden bazıları kurutma, yıkama, vakum ya da buhar uygulamasıdır. Ön işlemler asparajinin çekirdeğin içinden uzaklaşmasına yardım etmektedir. Bu sayede, asparajini indirgeyen enzim çekirdeğin dışındaki asparajinle daha fazla kontak kurmakta ve enzim çekirdeğin içine daha üniform bir şekilde yayılmaktadır. Kurutmaya çekirdeğin porları açılmakta ve enzimli solüsyonun çekirdeğin içine işlemesi için itici güç oluşmaktadır. Kurutma için farklı yöntemler (dondurarak kurutma, vakum kurutma, fırında kurutma, akışkan yataklı kurutucu gibi) kullanılmaktadır. Kurutma sıcaklığının çok yüksek olmaması gerekmektedir. Nem absorpsiyonunda itici bir güç olması için kurutulan çekirdeklerin nem oranının %10'un altında olması istenmektedir. Çekirdeklerin su içinde bekletilmesi çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir çünkü ürünün aromasında ve kalitesinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir.

Diğer bir uygulamada, yeşil kahve çekirdekleri öncelikle 5-60 dakika buhara tutulmakta ve ardından üzerine su spreylenebilir. Çekirdeklerin nem oranının yaklaşık olarak %15'in üzerine çıkması çekirdeklerin şişmesine neden olmakta ve asparajinin çekirdeğin dışına çıkması kolaylaşmaktadır. Enzimli solüsyon uygulandıktan sonra vakum ya da basınç uygulaması yapılması enzimin çekirdeğin içine nüfuz etmesini sağlamaktadır.

Partikül büyüklüğünün azaltılması ile daha fazla yüzey alanı oluşmakta ve solüsyon hızlı bir şekilde emilmektedir. Kahve çekirdeklerinin boyutu kırılarak ya da öğütülerek küçültülebilmektedir. Basınç suyun ya da enzimli solüsyonun çekirdeğe nüfuz etmesini sağlarken vakum çekirdekler arasındaki fazla havanın uzaklaşmasını ve enzimli solüsyonun çekirdeklerin içine daha kolay işlemesini sağlamaktadır.

Kahve Çekirdeklerine Asparaginaz Enzimi Uygulanması: Asparaginaz enzimi, kahve çekirdeğinin içindeki serbest asparajinin amit grubunu hidrolize edebilmektedir. Toz ya da sıvı formda bulunan asparaginaz kahve çekirdeklerine dökme, spreyleme ya da enzimli solüsyonda bekletmek gibi yöntemlerle uygulanabilmektedir. Firma tarafından yeşil kahve çekirdeği için tavsiye edilen doz 2.000-4.000 ASNU/kg yeşil kahve çekirdeğidir.

Enzimin Asparajinle Reaksiyona Girmesi İçin Yeterli Zamanın Verilmesi: Enzimin asparajinle reaksiyona girmesi için gereken süre kahve çekirdeğinin özelliklerine (örneğin; kimyasal kompozisyon, asparajin seviyesi, partikül büyüklüğü), eklenen enzimin özelliklerine ve ulaşılmak istenen asparajin seviyesine göre değişmektedir. Enzim çekirdeklerle muamele edildikten sonra çekirdeğin asparajin seviyesinde %10-90 seviyesinde bir azalma olabilmektedir. Genel olarak daha uzun süre enzim muamelesi yapmak daha yüksek seviyede asparajin düşüşü sağlamaktadır.

Enzimin Deaktivite Edilmesi: Enzim, istenen oranda reaksiyona girdikten sonra inaktif hale getirilmekte ya da kahve çekirdeklerinden uzaklaştırılmaktadır. Enzim; sıcaklık, pH değişikliği, proteaz uygulaması ya da bunların kombinasyonları ile etkisiz hale getirilebilmektedir. Ayrıca, tüketiminde sağlık riski olmayan enzimler üründen uzaklaştırılmayabilir.

Kahve Çekirdeklerinin Kavrulması: Kavrulmuş kahve elde etmek için yeşil kahve çekirdeklerinin yüksek sıcaklıkta kavrulması gerekmektedir. Fırında, mikrodalgada, buharda, infrared ve indüksiyonlu ocakta kavurma bu tekniklerden sadece bazılarıdır. Asparaginaz enzimi uygulamasının ardından kavrulan kahve çekirdeklerinde %90'a varan akrilamid azaltımı sağlanabilmektedir.

Serbest asparajin yönünden zengin olan gıdalarda bu yöntemin kullanılması daha uygun görülmektedir. Buğday kepeği (1,48 g/kg), çavdar kepeği (0,52-0,79 g/kg), kuşkonmaz (1,02-4,73 g/kg), patates yumrusu (0,02-17,0 g/kg) veya yeşil kahve (0,28-0,96 g/kg) yüksek miktarda asparajin içeren gıdalardan bazılarıdır. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) asparaginaz enzimini (*A. niger*, *A. oryzae* ve *Bacillus subtilis*'den üretilen) sağlık açısından tüketilmesinde bir sakınca

olmayan (GRAS) madde olarak onaylamıştır (Ciesarová vd., 2006). Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danimarka) firmasının Acrylaway® markasıyla piyasaya sürdüğü asparaginaz enzimi (*A. oryzae*'den üretilen) 2006 yılında Amerika'da GRAS statüsünü kazanmıştır. Katı ya da sıvı formu bulunan bu enzim (Şekil 1.17) için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60°C ve 7 olarak belirlenmiştir (Pedreschi, 2009).



Şekil 1.17 Novozymes-Acrylaway® (katı ve sıvı formu)

Patates matriksinde L-asparaginaz enzimi kullanımıyla ilgili ilk makale Zyzak vd. (2003) tarafından yayınlanmıştır. Asparaginaz enzimi uygulanan çiğ patatesin asparajin seviyesinin %88 oranında düştüğü, mikrodalga kullanarak pişirilen bu patates ürününün akrilamid seviyesinin enzim uygulanmayan patates ürününe göre %99 daha az olduğu raporlanmıştır. Bu sonuç, patates ürünlerinde akrilamid oluşumunda asparajinin önemli rol oynadığını göstermektedir.

Kukurova vd. (2009) hamur kızartmasının akrilamid oranını düşürmek için buğday ununa farklı oranlarda (100 ve 500 ASNU/kg un) asparaginaz enzimi eklemişler ve hamur kızartmasının akrilamid konsantrasyonunun %90'lara varan oranda azaldığını tespit etmişlerdir.

Bir grup araştırmacı tarafından nemlendirilen yeşil kahve çekirdeklerine değişen dozlarda (0-6000 ASNU/kg yeşil çekirdek) asparaginaz enzimi laboratuvar ölçeğinde uygulanmış ve üretilen kahvelerde %55-74 oranında akrilamid azaltımı sağlandığı görülmüştür (Hendriksen vd., 2013).

Amrein vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışma da L-asparaginaz enzimi eklenen hamurla hazırlanan zencefilli kekta %55 oranında akrilamid azaltımı elde

edilmiştir. Yine başka bir çalışmada, hamuruna asparaginaz (300 ASNU/kg un) enzimi eklenen patatesli krakerin akrilamid seviyesinin %70 oranında düştüğü saptanmıştır (Vass vd., 2004).

1.1.8 Akrilamid Analiz Yöntemleri

Akrilamid diğer gıda kontaminantlarına göre çok daha yakın zamanda araştırılmaya başlanan bir konu olmasına rağmen gıda analizcileri 2002 yılından bu yana gıdalarda akrilamid analizi için birçok analitik yöntem geliştirmişlerdir (Wenzl vd., 2010).

Literatür taraması yapıldığında akrilamid analizi için LC-MS, LC-MS/MS, GC, GC-MS ve HPLC yöntemlerinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Leung vd., 2003; Geng vd., 2008). GC yöntemi kullanılarak yapılan akrilamid tayinlerinde genellikle brom türevlendirmesi yapılmaktadır. Türevlendirme basamağı ise zahmetli ve zaman alıcı bir işlemdir. Türevlendirme basamağı gerektirmeyen LC-MS/MS yöntemi oldukça yüksek hassasiyet ve kararlılığa sahiptir. Ancak akrilamidin ve yavru iyonlarının düşük kütleyle sahip olması MS detektörüne gitmeden önce iyonların verimli bir temizleme (clean-up) prosedürüne tabi tutulması gerekmektedir (Başkan ve Erim, 2007). Tablo 1.4’de Avrupa’da laboratuvarlarda akrilamid analizi için kullanılan yöntemler gösterilmektedir.

Tablo 1.4 Avrupa’da uygulanan akrilamid analiz yöntemleri (Wenzl vd., 2010).

Ülke	Resmi Lab.	Özel Lab.	LC-MS ya da LC-MS/MS	LC-UV	GC-MS (EI/CI)	GC-MS (bromlama)
Avusturya	×		×			×
Belçika	×		×			
İsviçre	×	×	×		×	×
Almanya	×	×	×	×	×	×
İngiltere	×		×			×

1.1.8.1 Gaz Kromatografisi Metodu

Akrilamid analizi için kullanılan GC metodları brom türevlendirmeli ve brom türevlendirmesiz olarak iki ana grupta toplanmaktadır. Bromlandırma ile akrilamid daha uçucu bir bileşiğe dönüşmekte ve analizin seçiciliği artmaktadır. Prosedür önceden hazırlanan bromlulaştırma solüsyonunun (KBr, HBr, Br içeren) eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Örnek hazırlama aşamasında uygulanan ön işlemlerin gerekliliği matrikse bağlı olarak değişmektedir. Domates, mantar gibi matrikslerde türevlendirme öncesinde özel bir temizleme prosedürüne gerek duyulmazken protein yönünden zengin matrikslerde (et gibi) ek temizleme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Wenzl vd., 2003).

Bromun fazlası sodyum tiyosülfat çözeltisi (0,7-1,0 M) ile titrasyon yolu ile uzaklaştırılmaktadır. Bromlandırılmış akrilamid orginal maddeye göre daha az polardır ve organik çözücülerde daha kolay çözünmektedir. Genellikle, sulu fazdan analiti ekstrakte etmek için etil asetat ya da sikloheksan-etil asetat karışımları kullanılmaktadır (Castle, 1993).

Brom türevlendirmesiz GC metodunda ise türevlendirme basamağı atlanmakta, ekstraksiyon ve temizleme işleminden sonra ekstraktın akrilamid seviyesi direkt olarak ölçülmektedir. Ekstraksiyon çözeltisi olarak ise genellikle su ve su-organik çözelti (n-propanol ya da 2-butanon) karışımları kullanılmaktadır (Aktaş, 2008).

1.1.8.2 Sıvı Kromatografisi Metodu

Oda sıcaklığındaki su yayınlanan birçok LC metodunda ekstraksiyon solventi olarak kullanılmaktadır. Ekstraksiyon aşaması sırasında ısıtma ya da ultrasonik banyo işlemlerinden kaçınılmalıdır çünkü bu işlemler sırasında oluşabilecek küçük parçacıklar temizleme aşamasında kullanılan katı faz ekstraksiyon (SPE) kolonlarını doldurabilmektedirler. Ekstraksiyon işlemini yağ ayırma işlemi takip etmektedir. Bu işlem için hekzan, toluen veya sikloheksan gibi çözücüler kullanılmaktadır. Daha sonra, ekstrakt santrifüj edilip katı faz ekstraksiyonu gerçekleştirilmektedir. Patates ve tahıl bazlı ürünlerde yüksek miktarda bulunan protein, nişasta ve yağ gibi maddeler su ekstraksiyonundan sonra uzaklaştırılmalıdır. Karez çözeltilerinin kullanımı ile yağ ve kolloid içermeyen sulu

bir ekstrakt elde edilebilmektedir. Ancak amino asit gibi küçük moleküller ortamdaki tamamen uzaklaştırılmazlar. Patateslerdeki girişim katyon değiştirici yatak içeren bir SPE kartuşunun kullanılması ile tahıllardaki girişim ise lipofilik-hidrofilik yataklı bir SPE kartuşu ile engellenebilir. Akrilamidin metanolde iyi çözünmesi su yerine metanol kullanılan ekstraksiyon çalışmalarının yapılmasını sağlamıştır. Metanol ekstraksiyonu sonrasında Karez muamelesi metanolde çözünen proteinlerin çöktürülerek uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Akrilamidin kromatografik ayırması için en yaygın kullanılan sistem ise ters-faz kromatografi tekniğidir (kolon apolar, hareketli faz ise polardır). Hypercarb, μ -Bondapack C18 and Acqua C18 akrilamid analizinde en yaygın kullanılan kolon çeşitleridir (Ono vd., 2003; Wenzl vd., 2003).

Birçok temizleme prosedüründe çeşitli katı faz ekstraksiyonlarının kombinasyonlarından yararlanılmaktadır. Bir yaklaşımda, Oasis HLB ve Bond-Elut Accucat kartuşlarının temizleme yapmak için beraber kullanılması önerilmektedir. Oasis HLB (hidrofilik/lipofilik sorbent) kartuşu gıda örneğindeki kirlilikleri uzaklaştırmak için ilk olarak kullanılır ardından 2. temizleme kartuşu (Bond-Elut) yardımıyla akrilamid ekstraktı daha temizlenmiş (non-polar bileşikleri tutar) bir hale getirilmektedir. Bu yöntemin akrilamid analizi için en ideal temizleme tekniği olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Govaert vd., 2006).

Başka bir çalışmada, Bond Elut C18, Bond Elut Jr-PSA (anion exchange) ve Bond Elut Accucat kartuşları yardımıyla örnekler temizlenmiştir (Takatsuki vd., 2003). SPE kartuşlarının kullanımı ile akrilamid analizinde daha doğru sonuçlar elde edilmektedir (Alpözen, 2012).

1.1.9 Geleneksel Türk Kahveleri

Kahve sözcüğünün kökeni hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Etiyopya'da (Habeşistan) bir şehir olan Kaffa'ya fonetik benzerliğinden ötürü bu isimden türetildiği düşünülmektedir. Aslında eski Arapçada "kahve" sözcüğü bulunmaktaydı ve içki, şarap, bade ve koku anlamında kullanılmaktaydı (Hattox, 1996). Kanuni Sultan Süleyman zamanında (1520-1566) Osmanlıların Kızıldeniz'in iki yanına hakim olması üzerine Yemen ve Habeşistan'da bulunan

kahve ambarları ve limanlar Türklerin kontrolüne girmiş ve bu dönemde kahvehaneler aracılığıyla kahve İstanbul'da geniş kitlelerce tüketilmeye başlanmıştır. Bugün 70 ülkede kahve üretilmektedir ve bu ülkeler arasında Türkiye olmadığı halde bütün dünyada geçerli olan bir “Türk kahvesi” deyimini bulunmaktadır. Türk kahvesi kimliğinin oluşumunda, kahvenin yaygınlaşmasını ve dünya çapında tanınmasını sağlayan Türklerin geliştirdikleri kahve içme ritüelleridir. Türk kahvesinin telvesi, üzerindeki köpüğü, pişirildiği cezvesi ve ikram edildiği fincan onu diğer kahvelerden farklı kılmaktadır (Şekil 1.18). Kahvenin üzerindeki köpük içeceğin soğumasını ve kokusunun kaçmasını önlemektedir (Kuzucu ve Koz, 2015).



Şekil 1.18 Geleneksel Türk kahvesi cezvesi ve fincanı (Kuzucu ve Koz, 2015).

Kahve dünyada petrolden sonra en yüksek ticaret hacmine sahip olan üründür (Yılmaz vd., 2016). Türkiye’de kahve tüketimi her yıl artıyor olsa da kahve tüketimi bireylerin, yaş, cinsiyet, meslek, alışkanlık ve gelir düzeylerine göre farklılık göstermektedir. Yıllık kahve tüketiminin ülkemizde 45 bin tona (2016 yılı) ulaştığı ve kişi başı ortalama 920 g kahve tüketildiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, Türk kahvesi tüketiminin ülkemizde günlük bir fincan ile sınırlandırıldığını göstermektedir. Ayrıca, en çok tercih edilen kahve türlerinde Türk kahvesi birinci sırada yer alırken bunu hazır kahve ve filtre kahve takip etmektedir (Akşit, 2017).

Türk kahvesini diğer kahve çeşitlerinden ayıran bir özelliği ise en ince ayarda öğütülmüş olmasıdır. Öğütülmüş parçacıklarının yaklaşık %70’inin ölçüsünün 75-

125 mikron arasında olması gerekmektedir. Gereken öğütme seviyesine ulaşamadığında Türk kahvesi köpüksüz olmakta ve fincanda aşırı tortu bırakmaktadır (Özgür, 2019).

Türkiye'nin özellikle doğusunda yaygın olarak tüketilen başka geleneksel Türk kahvesi çeşitleri de bulunmaktadır. Dibek, Menengiç ve Mirra bu kahvelerden en bilinenleridir (Şekil 1.19) (Yılmaz vd., 2017). Menengiç kahvesi “bıttım” diye bilinen yabani Antep fıstığı türü olan *Pistacia terebinthus* adlı ağacın meyvelerinden elde edilmektedir. Menengiç kahvesi kafein içermeyen, yağ oranı yüksek bir içecektir. Menengiç kahvesinin pişirilmesinde su ya da süt kullanılmaktadır. Dibek kahvesinin kahve çekirdekleri, tahta ya da taştan yapılmış dibek denilen havanlarda dövülmektedir. Türk kahvesine göre daha yoğun kıvamlıdır ve yumuşak bir lezzete sahiptir. Türk kahvesi çeşitleri arasında öğütülme şekliyle ayrılan bir içecek olan dibek kahvesinin içine damla sakızı ve değişik aromalar eklenebilmektedir (Anonim, 2018a).

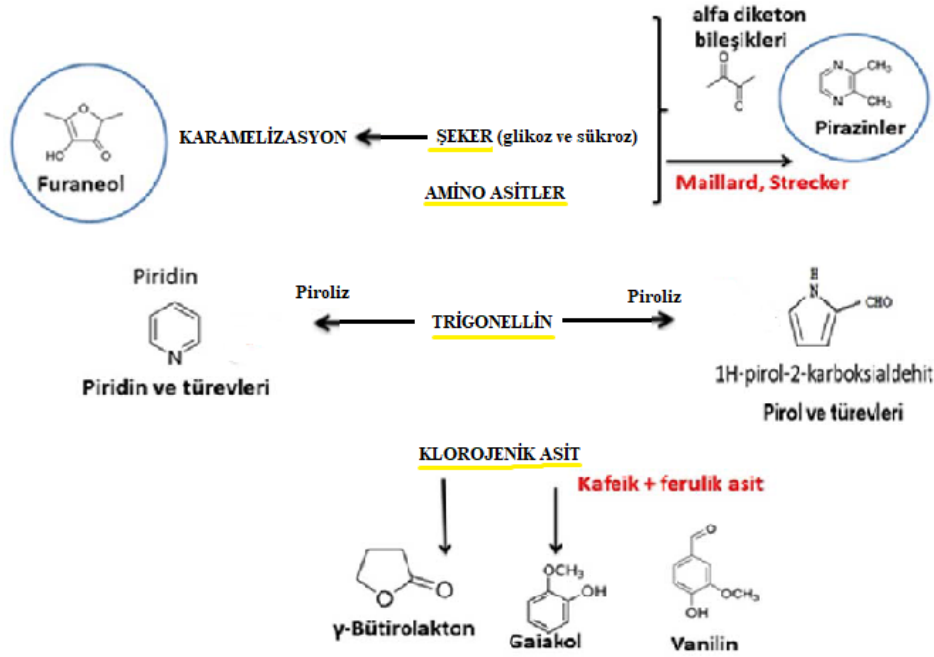


Şekil 1.19 Menengiç ve Dibek kahvesi

1.1.10 Kahve ve Aroma

Aroma açısından fakir olan yeşil kahve çekirdeği, fenolik ve antioksidan bileşenler yönünden oldukça zengindir. Kahve, aroma ve lezzet bileşiklerine kavrulduktan sonra kavuşmaktadır. Bu nedenle, yeşil kahve çekirdeklerinin yüksek sıcaklıklarda kavrulması istenilen kahve aromasının eldesi için zorunludur (Buffo ve Cardelli-Freire, 2004). Yeşil kahve çekirdeklerinin kimyasal kompozisyonu kavurma esnasındaki aroma oluşumunda önemli roller oynamaktadır (Fisk vd., 2012). Maillard reaksiyonu kahvede aroma oluşumundan sorumlu reaksiyonların başında gelmektedir. Amino asitler ve indirgen şekerler reaksiyona girerek azotlu

heterosiklikler ve kahverengi melanoidinler oluşturmaktadır (Şekil 1.20) (Illy ve Viani, 2005). Bu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu ile yüzlerce uçucu bileşik meydana gelmekte ve kahvenin duyusal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Şeker, amino asit ve klorojenik asit gibi öncül maddeler aroma maddelerinin oluşumunu ve kahvenin son lezzetini etkilemektedir (Wong vd., 2008; Liu vd., 2018).



Şekil 1.20 Kahve aromasının oluşum mekanizması (Poisson vd., 2009; Ayseli, 2015)

Önceki yapılan çalışmalara göre Arabica kahveler tatlı, karamel ve kavrulmuş aromaya Robusta kahveler ise topraksı, baharatlı ve kavrulmuş aromaya sahiptir (Blank vd., 1991). Sükröz şekeri, kahvenin organoleptik özelliklerinin gelişimi açısından önemlidir ve Arabica kahveler Robusta kahvelere göre sükröz açısından daha zengindir (Illy ve Viani, 2005).

Kahveler, kavurma işleminde uygulanan sıcaklık ve süreye göre az kavrulmuş (light roasted), orta kavrulmuş (medium roasted) ve koyu kavrulmuş (dark roasted) olarak sınıflandırılmaktadır (Mondello vd., 2005).

Kahvelerin aroma bileşikleri birçok bilim insanı tarafından incelenmiştir. Kavrulmuş/öğütülmüş kahvede farklı kimyasal sınıf ve karakterde 700'ün

üzerinde aroma maddesi belirlenmiştir (Blank vd., 1992). Aroma yönünden zayıf olan yeşil kahvede ise bu bileşiklerin tanımlanması zordur (Hashim ve Chaveron, 1995). Kahvede bulunan aroma bileşiklerinin %50'sini, furanlar, piranonlar, tiyofenler, pirazinler, piroller, okzazoller, tiyazoller, piridinler, aminler, sülfür bileşikleri oluşturmaktadır. Ketonlar (%9,5), fenoller (%9,2), hidrokarbonlar (%7,8), asitler (%6,9), esterler (%5,8), alkoller (%4,9), aldehitler (%4,4) ve laktonlar (%1,5) ise kahvede bulunan diğer aroma maddeleridir (Ayseli, 2015).

1.1.10.1 Aroma Analizi Yöntemleri

Gıda örneklerinin aroma analizine hazırlanması için genel olarak aşağıda belirtilen yöntemler kullanılmaktadır (Deibler vd., 1999).

*Solvent Ekstraksiyonu

*Statik Headspace

*Katı Gözenekli Polimer

*Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)

Gözenekli polimer emiciler yardımıyla tepe boşluğundaki uçucu bileşenlerin izolasyonu, aroma maddelerinin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Teranishi ve Kint, 1993). Absorpsiyon yöntemlerinden biri olan SPME Arthur ve Pawliszyn (1990) tarafından geliştirilmiştir. SPME tekniği, hava ya da su matrisindeki maddeleri, ergitilmiş silika üzerine polimer kaplı fibere ekstrakte eden basit, hızlı, duyarlı ve organik çözücüden bağımsız bir örnek hazırlama yöntemidir. SPME aparatları ticari olarak üretilmiş durumdadır. SPME aparatının en önemli parçası ergitilmiş silika fiberidir, bu fiber polidimetilsiloksan gibi emici bir materyalle kaplıdır (Yang ve Peppard, 1994). Tepe boşluğu (HS) tekniğinde, fiber örneğin üzerindeki tepe boşluğuna indirilmekte ve matriksten salınan analitler fiberin yüzeyine absorbe olmaktadır. Yüzeyde konsantre edilen uçucu organik analitler bir analitik enstrümanda analiz edilmektedir (Zhang ve Pawliszyn, 1995).

Petisca vd. (2013), kavurma hızının espresso kahvede furanlara ve diğer uçucu bileşiklere olan etkisini tespit etmek için SPME yöntemini kullanmıştır. Türk kahvesi örneklerinin uçucu bileşenlerinin gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) ile saptanmasında en uygun izolasyon yönteminin DVB/CAR/PDMS

fiberin kullanıldığı HS/SPME yöntemi olduğu belirlenmiştir (Kıvançlı ve Elmacı, 2015).

Amanpour ve Selli (2016) DB-Wax kolon kullanarak GC-MS cihazında Türk ve French Press kahvesinin uçucu bileşenlerini analiz etmiştir. Türk kahvesinde furan, lakton, fenolik bileşik, piridin, pirazin, asit, siklopenten, pirol, furanon, keton, alkol, aldehit ve tiyol aroma grubuna ait toplam 60, French Press kahvesinde ise toplam 58 bileşik tespit edilmiştir. Tespit edilen bileşiklerden furanlar ve laktonlar en yüksek seviyede bulunanlardır. Bunun yanında, 2 kahve çeşidinin uçucu bileşenler profilinin birbirine oldukça benzediği saptanmıştır. Guaiakol, 2,3-butanedion ve furfuril asetatın en yüksek koku aktiflik (OAV) değerine sahip olduğu görülmüştür. Aroma maddelerinin tanımlanmasında kütle spektroskopisinin kütüphanesi (MS), aroma maddeleri standartları ve linear alıkonma indisi (LRI) değerlerinden faydalanılmıştır.

Ayseli (2015) tarafından yapılan yüksek lisans tezinde Türk kahvesinin aroma ve aroma-aktif bileşikleri üzerine farklı kavurma işlemlerinin etkisini incelenmiştir. Orta ve koyu kavrulmuş Türk kahvesi örneklerinden sırasıyla 72 ve 57 adet aroma bileşiği tespit edilmiştir. Türk kahvesindeki aroma bileşiklerinin büyük bir kısmını pirazin ve keton bileşikleri oluşturmuş, bunları furan ve fenol bileşikleri izlemiştir.

1.1.11 Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt yüzey yöntemleri sahip oldukları avantajlardan dolayı gıda mühendisliğinde işlem veriminin ve ürün kabulünün yüksek olması için kullanılmaktadır. Kolay optimizasyon ve parametreler arasındaki etkileşimin belirlenebilmesini sağlaması yöntemin başlıca avantajlarıdır. Bağımsız değişken deneyde etkisi araştırılan parametrelere verilen addır. Bağımlı değişkenler ise bağımsız değişkenlere bağlı olarak değişen değişkenlerdir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010; Turan ve Altundoğan, 2011). Yöntem bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten oluşmaktadır. Bu teknik sayesinde bağımsız değişkenlerin proses üzerine olan etkileri tek tek ve interaksiyonlar halinde incelenebilmektedir. Ardından, sistemi tanımlayacak lineer veya polinomiye fonksiyonlar geliştirilmektedir. Bu sayede,

daha kolay bir şekilde değişkenlerin optimum değerlerini belirlemek mümkün hale gelmektedir (Sağcan, 2016).

1.1.12 Kahve ile ilgili Tebliğler

Öğütölmüş kahvenin kalite kriterlerini oluşturan bazı parametreler (rutubet, kül, suda çözönen madde, kafein gibi) Resmi gazetede 2016 yılında yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Kahve ve Kahve Ekstraktları Tebliğinde (Tebliğ No: 2016/7) yer almaktadır. Bu Tebliğ, *Coffea arabica L.*, *Coffea canephora var. robusta*, *Coffea robusta*, *Coffea liberica* türlerinden üretilen kahveleri kapsamaktadır.

Avrupa Birliği'nde içme suyu direktifi (98/83/EC) ve ölkemizde "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliği" gereği 0,1 µg/L değeri sularda akrilamid için sınır değer olarak belirlenmiştir (Anonim, 2005). Ancak dünyada hiçbir ölkede kahvede ya da diğer gıdalarda akrilamid seviyesi için belirlenmiş maksimum bir limit bulunmamaktadır. Öte yandan, Avrupa Komisyonu'nun yaptıkları denetimler sonucunda farklı gıda matrikslerinin akrilamid seviyeleri için önerdiği gösterge değerler (indicative values) bulunmaktadır. Kavrulmuş kahve (kuru) ve çözönebilir kahve için bu değerler sırasıyla 450 ve 900 µg/kg olarak belirlenmiştir. Kahve ikameleri için belirlenmiş bir gösterge değer bulunmamaktadır (EFSA, 2012). Firmaların gıda ürünlerinin belirlenen gösterge değerleri geçtiği saptanırsa ürünün akrilamid seviyesini düşörmeleri için bazı önlemler alması istenmektedir. Ayrıca, gıdalardaki HMF seviyesi için bal matriksi dışında belirlenmiş yasal bir limit bulunmamaktadır (Vorlova vd., 2006).

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, piyasadaki geleneksel Türk kahvelerinin bazı kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirlemenin yanında düşük konsantrasyonda akrilamid içeren ve duyuşal özelliklerini koruyan Türk kahvesi üretmek için en optimum asparaginaz enzimi uygulama koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu hedefi gerçekleştirebilmek için aşağıda verilen çalışmalar yapılmıştır:

1. Piyasadan toplanan kahvelerde akrilamid ve bazı fiziko-kimyasal analizlerin yapılması, akrilamid konsantrasyonu ile bu parametreler arasındaki korelasyonların incelenmesi

2. Yanıt-Yüzey yöntemi kullanılarak Merkezi Karma Tasarım'ın oluşturulması
3. Oluşturulan Merkezi Karma Tasarım'a göre asparaginaz enzimi uygulamalarının yapılması ve elde edilen sonuçlara göre optimum koşulların belirlenmesi

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında, potansiyel bir kanserojen olan akrilamidin miktarı Türk kahvesi üretiminin model olarak kullanıldığı sistemde asparaginaz enzimi uygulamasıyla azaltılacağı varsayılmaktadır. Asparaginaz enziminin, yeşil kahve çekirdeklerindeki L-asparajin aminoasidini L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizini katalize etmesinin bu azaltımı sağlayacağı düşünülmektedir çünkü kahvede akrilamid oluşumunu sınırlayan temel öncü maddenin asparajin amino asidi olduğu önceki çalışmalarda saptanmıştır.

2.1 Materyal

2.1.1 Kahve Numuneleri

36 adet paketlenmiş geleneksel Türk kahvesi örneği (20 Türk kahvesi, 8 Dibek ve 8 Menengiç) Bursa'daki yerel marketlerden temin edilmiştir. Orta kavrulmuş olan Türk kahvesi örneklerinin üretildiği yeşil kahve çekirdeklerinin türü Arabica'dır. Türk ve dibek kahveleri toz, menengiç kahveleri ise macun formundadır. Raf ömrünün başında olan ve en yaygın markalardan seçilen örnekler analiz edilene dek -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Projenin üretim kısmında Şenöz kahve firmasından temin edilen Arabica türü yeşil kahve çekirdekleri kullanılmıştır.

2.1.2 Enzim

Acrylaway® L sıvı ürünü 3500 ASNU/g aktiviteye sahiptir ve Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir.

2.1.3 Alet Ekipman Tanımları

- Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS 8040, Shimadzu, Japonya)
- Inertsil ODS-4 (3 µm, 4,6×150 mm) LC kolonu (GL Sciences, Japonya)
- C18 4×3 mm koruyucu kolon (Phenomenex, Torrance, Kaliforniya, ABD)
- HPLC Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (1100) DAD dedektör (Agilent)
- HPLC (1100) Refraktif Index Detectors-RID 10A (Shimadzu, Japonya)
- HPLC NH₂-RP kolon (250mm x 4mm)
- HPLC Eclipse XDB C18 kolon (4,6mm x 150mm x 5µ)
- Symmetry C18 kolon (250mm x 4,6mm, 5µm)
- Agilent 7200B Dörtlü Uçlu Uçuş Zamanlı GC/MS sistemi (GC/Q-TOF, ABD)
- 20 mL amber vial (SU860098, Supelco, Amerika), Silikon/PTFE kapak (SU860101, Supelco, ABD)

- Agilent ZB-WAXms kolon (30m×0,25mm×0,25μm)
- 50/30 μm DVB/CAR/PDMS SPME fiber (Supelco, ABD)
- Delonghi kahve öğütücü (KG521M, İtalya)
- Kahve kavurma makinesi (Bar-Well, ABD)
- Su banyosu (Buchi B-491, İsviçre)
- Arçelik Türk kahvesi pişirme makinası (Telve, K 3300, Türkiye)
- Etüv (Dedeoğlu, Türkiye)
- pH metre (Mettler Toledo, ABD)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Santrifüj makinesi (Eppendorf 5804, Almanya)
- PTFE filtreler (0,45μm)
- Laboratuvar Cam Malzemeleri (Mezür, erlenmayer, balonjoje, pipet vs.)
- Analitik Terazı (±0.001 g hassasiyette) (HM-200, ABD)
- Ulta Saf Su Cihazı
- Mobil Faz Süzme Aparatı
- Tüp çalkalayıcı (Heidolph Schwabach, Almanya)
- Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (MR 3002, Heidolph, Almanya)
- Vakum pompası (Heidolph, Rotavac, Almanya)

2.1.4 Kullanılan Kimyasallar

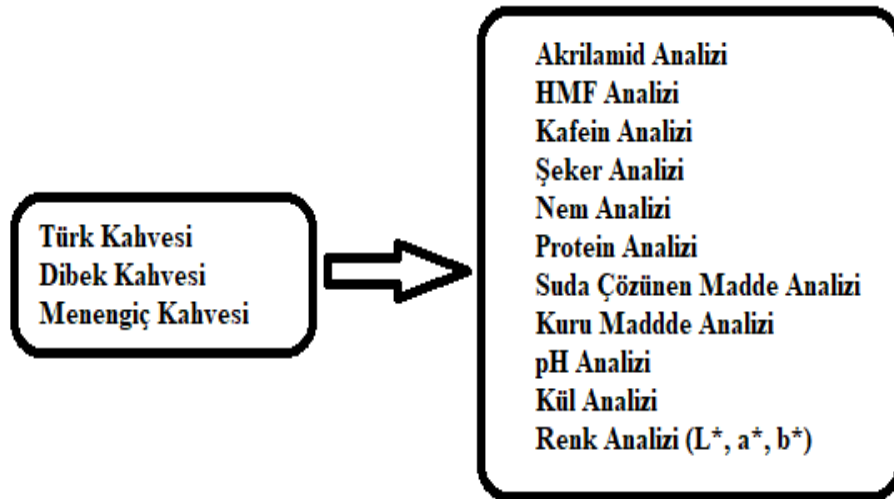
Akrilamid (%99,3) ve akrilamid-d₃ (500 mg/mL asetonitril içinde) (AAd₃) standartları sırasıyla Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Almanya) ve Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmalarından temin edilmiştir. 5-Hidroksimetil-2-furfural (%97,9) standardı Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), o-fosforik asit (%85) (H₃PO₄), potasyum hekzasiyanoferrat (II)-trihidrat (K₄Fe(CN)₆·3H₂O), çinko sülfat heptahidrat (ZnSO₄·7H₂O), kafein, glikoz, fruktoz, maltoz, sükroz, asetonitril (ACN), methanol (MeOH), formik asit (FA) (%98) ve n-hekzan (>%99) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Oasis HLB (200 mg, 6 mL) ve Bond Elut-Accucat (200 mg, 3 mL) SPE kartuşları sırasıyla Waters (Milford, ABD) ve Varian (Şikago, ABD) markalıdır.

L-asparajin, Borate Buffer, Orto-fitalaldehit (OPA) ve 9-fluometil kloroformat (FMOC) kimyasalları Agilent, Hidroklorik asit (HCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Sülfö Salisilik Asit Sigma-Aldrich markalıdır.

Aroma standartları olarak 2,3-bütandion (ChemService), 2-metilpirazin (ChemService), 2,3-pentandion (ChemService), asetoin (3-hidroksi-2-bütanon) (LGC), asetik asit (ChemService), furfuril asetat (ChemService), fenol (ChemService), pirol (ChemService), 2-hekzanol (Ehrenstorfer), 5-hidroksi-2-furfural (Ehrenstorfer), furfural (2-furfurol, 2-furaldehid) (Ehrenstorfer), heksadekanoik asit (Ehrenstorfer), indol (Ehrenstorfer), izovalerik asit (Ehrenstorfer), maltol (Ehrenstorfer), 2-siklopenten-1-one (LGC), 2-metoksifenol (guaiakol) (LGC), 2,5-dimetilpirazin (LGC), 3-metil-2-bütenal (LGC), hidroksiaseton (LGC), *p*-vinilguaiakol (LGC), pirazin (LGC), vanillin (LGC), 2,3-dimetilpirazin (Sigma), cis-4-karen (LGC) ve 2,6-dimetilpirazin (Sigma) kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

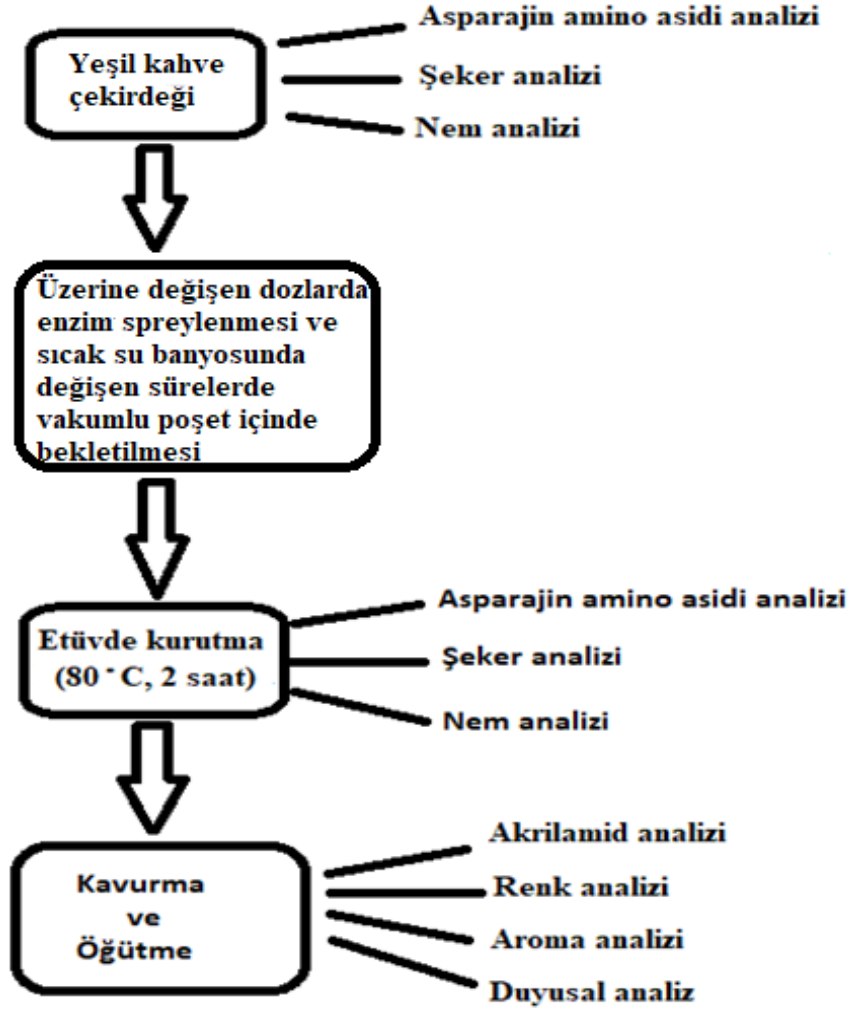
Piyasadan toplanan kahve numunelerinde, akrilamid ($\mu\text{g/kg}$), şeker (mg/kg), HMF (mg/kg), nem (%), protein (%), kül (%), suda çözünen madde (%), kuru madde (%), kafein (%), pH ve renk analizleri yapılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Piyasadan toplanan kahve örneklerinde gerçekleştirilen analizler

Projenin üretim kısmında enzim uygulanan ve kurutulan yeşil kahve çekirdeklerini kavurmadan önce nem, şeker ve asparajin amino asidi analizi yapılmıştır.

Kavrulup öğütülen kahvede ise akrilamid, aroma, renk ve duyuusal analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Üretilen kahvelerde gerçekleştirilen analizler

2.2.1 Deneyisel Tasarım

Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yeşil kahve çekirdeklerine asparaginaz enzimi uygulama koşulları parametrelerinin kahvede akrilamid ve aroma bileşiklerinin oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Yanıt yüzey yöntemi; 3-seviyeli faktoriyel dizayn, Box-Behnken dizayn ve merkezi karma dizayn olarak kategorilere ayrılmaktadır. Bu çalışmada, deneysel tasarım olarak merkezi karma tasarım (MKT) seçilmiştir. Bağımsız değişken olarak doz (X1) ve süre (X2) belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri

Bağımsız değişkenler	Faktör Seviyeleri		
	Düşük (-1)	Merkez (0)	Yüksek (1)
Doz (ASNU)	0	2000	4000
Süre (dakika)	30	75	120

Tablo 2.2’de uygulanan MKT’ye ait denemelerin değişkenleri (doz ve süre) ve 5 adet merkezi noktalı 13 farklı uygulama içeren deneme deseni verilmiştir.

Tablo 2.2 Uygulanan merkezi karma tasarım

Kodlanmış Değişkenler			Bağımsız Değişkenler	
Deney no ^a	X1	X2	Doz (ASNU)	Süre (dakika)
1	0	-1	2000	30
2	0	0	2000	75
3	-1	0	0	75
4	-1	-1	0	30
5	0	0	2000	75
6	1	0	4000	75
7	-1	1	0	120
8	0	0	2000	75
9	0	0	2000	75
10	1	1	4000	120
11	0	1	2000	120
12	0	0	2000	75
13	1	-1	4000	30

^aRastgele seçilmiş

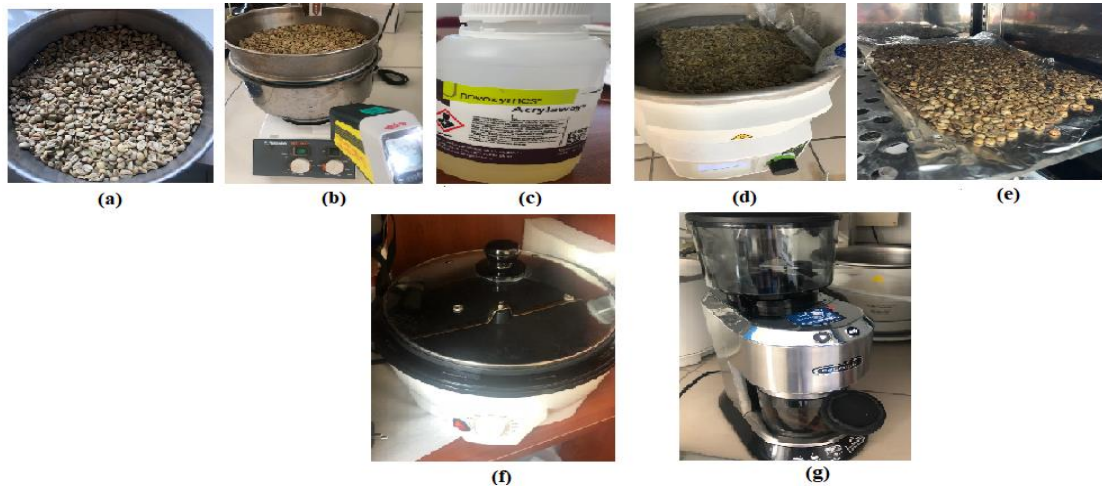
$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^n \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \alpha_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \alpha_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2.1)$$

Modeller Denklem 2.1’de verilen kuadratik (polinomiye) denkleme göre belirtilmiştir. Burada Y bağımlı değişken, X bağımsız değişken, n bağımsız değişken sayısı, α_0 sabit katsayı, α_i birinci dereceden (doğrusal) denklem katsayısı,

α_{ij} iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısı α_{ii} ikinci dereceden denklem katsayısı ve ε deneysel hatadır.

2.2.2 Yeşil kahve çekirdeklerinin enzimle muamelesi ve kahve üretimi

Çalışmanın üretim kısmında, laboratuvar ölçeğinde üretilen Türk kahvelerinde asparaginaz enzimi uygulamasının ürünün akrilamid konsantrasyonunu nasıl etkilediği incelenerek en optimum üretim koşulu belirlenmeye çalışılmıştır. Yeşil kahve çekirdekleri MKT ile belirlenen koşullarda enzimle muamele edilip etüvde kurutulmuş (80°C, 2 saat) ve akabinde ev tipi kavurucuda (180°C, 20 dakika) kavrulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Yeşil kahve çekirdeklerinin tartılması (180 g) (a), çekirdeklerin porlarının açılması için 45 dakika 100°C'lik su buharına tutulması (b), farklı konsantrasyonlardaki (0-4000 ASNU) sulu asparaginaz enzimi solüsyonunun (40 mL, 60°C) çekirdeklerin üzerine spreyleneceği (c), vakum poşeti içinde vakumlanan çekirdeklerin değişen sürelerde (30-120 dakika) 60°C'lik su banyosunda bekletilmesi (d), çekirdeklerin 80°C'lik etüvde 2 saat boyunca kurutulması (e), kurutulmuş çekirdeklerin 180°C'de 20 dakika kavrulması (f), kavrulan çekirdeklerin en ince ayarında öğütülmesi (g)

2.2.3 Akrilamid Analizi

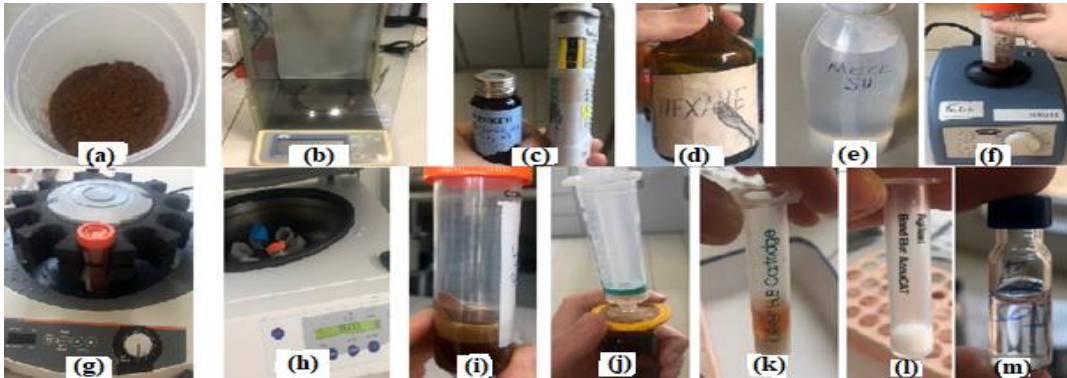
2.2.3.1 Akrilamid Standartlarının Hazırlanması

Akrilamid ve akrilamid-d₃ stok çözeltileri saf su (%0,1 FA içeren) ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, 10 mg akrilamid standardı su ile 10 mL'ye tamamlanarak 993 mg/L'lik akrilamid ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca, 500 mg/L akrilamid-d₃ standardından 100 µL alınıp su ile 10 mL'ye tamamlanarak

5 mg/L'lik çalışma standardı hazırlanmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.2 Akrilamid Analizi İçin Örnek Hazırlama

Örneklerin akrilamid seviyesini LC-MS/MS cihazında tespit edebilmek için Roach vd. (2003) tarafından önerilen yöntemin basamakları takip edilmiştir (Şekil 2.4). Homojen hale getirilmiş örnekten, 50 mL'lik falkon tüpe 1 g tartılmıştır. Örnek üzerine 100 μ L AAd₃ (5 mg/L) standardı ve 5 mL hekzan eklenip vorteks yapılmıştır. 10 mL saf su eklenip tekrar vortekslendi ve tüp çalkalayıcıya koyulan örnek 20 dakika boyunca çalkalanmıştır. Santrifüj cihazı kullanılarak 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hekzanlı kısım atılıp sulu katmandan 5 mL alınıp 0,45 μ m'lik PVDF şırınga ucu filtreden süzölmüştür. 3,5 mL metanol ve 3,5 mL saf su ile şartlandırılan Oasis HLB kartuşa elde edilen süzöntüden 1,5 mL eklenmiştir. Süzöntü aktıktan sonra 0,5 mL saf su ile kartuş yıkanmış ve 1,5 mL saf su eklenip süzöntü bir şişede 2. temizleme (clean-up) için toplanmıştır. 2,5 mL metanol ve 2,5 mL saf su ile şartlandırılan Bond Elut Accucat SPE kartuşa elde edilen süzöntünün tamamı eklenmiş ve 0,5 mL'lik kısım akıtıldıktan sonra 1 mL'lik süzöntü vialle toplanmıştır. Vial LC-MS/MS 8040'da analiz edilmiştir.



Şekil 2.4 Öğütülmüş kahve örneği (a), 1 g kahvenin hassas terazide falkon tüpe tartılması (b), iç standardın 500 μ g/kg seviyesinde tartılan kahve üzerine eklenmesi (c), 5 mL hekzan eklenmesi (d), 10 mL saf su eklenmesi (e), tüpün vortekslenmesi (f), tüpün karıştırıcıda 20 dk çalkalanması (g), tüpün santrifüj edilmesi (h), tüpte ayrılan fazın sulu kısmından 5 ml alınması (i), karışımın filtreden süzülmesi (j), Oasis HLB kartuşla 1. temizleme (clean-up) aşaması (k), Bond Elut AccuCAT kartuşla 2. temizleme aşaması (l), elde edilen ekstraktın viallenmesi (m)

2.2.3.3 Kalibrasyon Eğrisi

Tablo 2.3’de belirtildiği gibi kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 1 g öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğine 30, 50, 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde olacak şekilde akrilamid ve 500 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde olacak şekilde akrilamid- d_3 standartlarından kirlenme yapılmıştır.

Tablo 2.3 Kalibrasyon eğrisi eldesi için kullanılan standartlar ve hacimleri

Akrilamid standardının konsantrasyonu ($\mu\text{g/kg}$)	Alınan hacim (μL)	Akrilamid- d_3 standardı konsantrasyonu ($\mu\text{g/kg}$)	Alınan hacim (μL)
150	200	5000	100
250	200	5000	100
500	200	5000	100
1250	200	5000	100
2500	200	5000	100
5000	200	5000	100

2.2.3.4 Metod Validasyon Parametreleri

LC-MS/MS cihazının kahve matriksinde akrilamid analizi için uygun olup olmadığını anlamak için aşağıda verilen parametreler değerlendirilmiştir (Anonim, 2018b).

- Doğrusallık
- Tespit limiti (Limit of Detection, LQD)
- Ölçüm limiti (Limit of Quantification, LOQ)
- Doğruluk
 - Kesinlik (Precision)
 - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Tekrar üretilebilirlik (Reproducibility)
 - Gerçeklik (Trueness)
 - Geri Kazanım (Recovery)

Doğrusallık çalışmasında, iç standart metoduna göre kalibrasyon eğrisi (Akrilamid/Akrilamid-d₃ konsantrasyon oranına (x-ekseni) karşı Akrilamid/Akrilamid-d₃ sinyal oranı (y-ekseni)) çizilmiştir. Lineer regresyon analizi uygulanmış ve doğrusal aralık belirlenmiştir.

LOD ve LOQ değerleri EURACHEM (1998) rehberine göre belirlenmiştir. Denklem 2.2'ye göre standart sapmalar belirlenmiş ve standart sapmaların (s) 3 katı LOD, 10 katı ise LOQ olarak hesaplanmıştır.

$$LOD = C_0 + 3 \times s$$

$$LOQ = C_0 + 10 \times s$$

$$C_0 = \text{Blank örnekteki konsantrasyon}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \begin{array}{l} s: \text{standart sapma} \\ x: \text{Ölçüm sonuçlarının ortalaması} \\ x_i: \text{Her bir ölçüm sonucu} \\ N: \text{Yapılan çalışma sayısı} \end{array} \quad (2.2)$$

Standart sapma değerini belirlemek için öğütülmüş yeşil kahve çekirdekleri 30 µg/kg seviyesinde akrilamid ve 500 µg/kg seviyesinde akrilamid-d₃ ile kirletilerek toplam 10 adet bağımsız çalışma yapılmıştır.

Cihazın ve metodun tekrarlanabilirlik (gün içi) ve tekrar üretilebilirlik (günler arası) değerleri öğütülmüş yeşil kahve çekirdeklerine 2 farklı seviyede (30 ve 250 µg/kg) akrilamid ve 500 µg/kg seviyesinde akrilamid-d₃ spike edilerek 2 analist tarafından hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik değerini hesaplamak için 2 bağımsız çalışma yapılmıştır. Belirtilen seviyelerde spike yapılan örnekler aynı gün içerisinde 6 defa analize alınmış ve elde edilen sonuçlardan tekrarlanabilirlik değeri belirlenmiştir.

Tekrar üretilebilirlik değerini belirlemek için 2 farklı konsantrasyonda akrilamid ve 500 µg/kg seviyesinde akrilamid-d₃ ile kirletilen örnekler farklı günler (5 gün) içinde 6 defa analize alınmıştır.

Geri kazanım yüzdesi, 100 ve 250 µg/kg konsantrasyonlarında olacak şekilde akrilamid standardı ilave edilerek kirletilen toz yeşil kahve çekirdekleri analiz edilerek belirlenmiştir.

2.2.3.5 Analitik Koşullar

Akrilamid analizi Shimadzu marka LC-MS/MS 8040 cihazında, elektrospray iyonizasyon (ESI) ile gerçekleştirilmiştir. Analitik ayırma için Inertsil ODS-4V (150×4,6 mm; 3 µm) kolon ve C18 (4×3 mm) koruyucu kolon kullanılmıştır. 10 dakikalık bir metod oluşturulmuş ve izokratik akış (mobil faz A: %0,1 formik asit içeren (v/v) saf su (%90 oranında) ve mobil faz B: metanol (%10 oranında)) kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dak. ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Kolon fırın sıcaklığı 40°C, DL sıcaklığı ise 250°C'dir. Seçilmiş iyon görüntüleme modu (SIM) kullanılmış ve akrilamid için 72,10>55,20>27,20 (m/z) değerleri, iç standart için 75,20>58,15>30,10 (m/z) değerleri taranmıştır. Durma süresi (dwell time) değeri 151 msec ve Q1 Pre Bias değeri -12,0 V'dır. Çarpışma enerjisi (CE) akrilamid için -15 eV ve akrilamid-d₃ için -23 eV olarak belirlenmiştir. Q3 Pre Bias (V) voltaj değeri akrilamid için -24, iç standart için -28'dir.

2.2.4 Serbest Amino Asit Analizi

Amino asit analizi Henderson vd. (2000) önerdiği yöntemle göre yapılmıştır.

2.2.4.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Ana Stok Standart Çözeltisi: Toz haldeki asparajin standardından 100 mg tartılarak 100 mL'ye kadar 0,1 N HCl (8,28 mL HCl 1000 mL'ye ultra saf su ile tamamlandı) eklendi ve 1000 mg/L (ppm) ana stok hazırlanmıştır.

Çalışma Çözeltileri: 0,5, 1,25, 2,5 ve 5 mg/L çalışma çözeltileri 0,1 N HCl ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.4.2 Serbest Amino Asit Analizi İçin Örnek Hazırlama

-Homojen hale getirilmiş örnekten, 100 mL'lik amber renkli vidalı kapaklı analiz şişesi içine 0,5 g tartılmıştır.

-Bir miktar ultra saf su eklenerek çözünmesi sağlanmış, 1 mL SSA (2,5 g 5-Sülfosalisilik asit dihidrat tartılıp ultra saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır) eklenip saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

-Ultrasonik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir.

-Numune yüksek devirde santrifüj (10.900 devir/dak) edildikten sonra berrak kısımdan alınarak 0,45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek HPLC'ye enjekte edilmiştir.

2.2.4.3 Analitik Koşullar

Mobil Faz A: NaH₂PO₄H₂O (5,5 gr sodyum dihidrojen fosfat tartılmış, 1 L'ye su ile tamamlanıp, pH 7,8'e 10 N NaOH ile ayarlanmıştır)

Mobil Faz B: ACN:MeOH:H₂O (45:45:10, v/v/v)

DAD Dedektör Koşulları:

Dalga boyu (nm)	Bant genişliği (nm)	Referans dalga boyu (nm)	Referans bant genişliği (nm)
338	10	390	20

Kolon Fırını Sıcaklığı: 40°C

Akış hızı: 2mL/dakika

Gradient Program

Zaman (dakika)	%B
0	0
1,9	0
18,1	57
18,6	100
22,3	100
23,2	0
26	0

2.2.5 Kafein Analizi

Kafein analizi, Prodoliet ve Bruelhart (1993) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır.

2.2.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon Çözelti (0,0125 M KH₂PO₄)

Potasyum dihidrojen fosfat 1,7 g tartılıp, saf su ile çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlanmıştır. pH 3,5'e %5'lik o-fosforik asit ile ayarlanmış, 0,45 µm'lik

membran filtreden süzme aparatı ile süzöldükten sonra ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

%5'lik o-fosforik asit

%85'lik o-fosforik asitten 3,4 mL alınıp 100 mL'lik ölçölü balonun içine alınarak çizgisine tamamlanmıştır.

Carrez Çözeltileri

Carrez I: 7,2 g Çinko sülfat heptahidrat çifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Carrez II: 3,4 g Potasyum hexasiyano ferrat (II) trihidrat çifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Standart Stok Çözeltisi

50 mg standart madde ultrasafsu ile 100 mL'ye tamamlanmış ve böylece 500 mg/L'lik stok çözelti hazırlanmıştır.

Çalışma Çözeltileri

500 mg/L'lik stok çözeltiden 0,10 mg/L, 0,25 mg/L, 1 mg/L ve 5 mg/L'lik çalışma çözeltileri ultrasafsu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.5.2 Analitik Koşullar

%90 tampon ve %10 asetonitril içeren karışım mobil faz olarak kullanılmıştır. Dalga boyunu tarayan diyotdizimli (DAD) ile yapılan dalga boyu taramasında en yüksek pikin 206 nm'ye ait olduğu gözlenmiştir. Kolon fırını sıcaklığı 25°C ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir.

2.2.5.3 Numunenin Hazırlanması

Örnek iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Örnekten 100 mL'lik ölçölü balon içine 1 g tartılıp üzerine 1'er mL Carrez I ve Carrez II çözeltileri, 5 mL %25'lik amonyak konularak kaynarsu banyosunda 15-20 dakika tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulup 100 mL seviyesine saf su ile tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 10 dakika tutulmuştur. 0,45 µm'lik enjektör ucu filtresinden süzölerek vial e alınmıştır.

2.2.6 HMF Analizi

HMF analizi, Prodoliet ve Bruelhart (1993) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır.

2.2.6.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon   zelti (0,0125 M KH₂PO₄)

Potasyum dihidrojen fosfat 1,7 g tartılıp saf su ile çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlanmıştır. pH 3,5'e %5'lik o-fosforik asit ile ayarlanmıştır. 0,45  m'lik membrane filtreden süzme aparatı ile s z lm şt r. Ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

%5'lik o-fosforik asit

%85'lik o-fosforik asitten 3,4 mL alınıp 100 mL'lik  l  l  balonun içine alınarak çizgisine tamamlanmıştır.

Carrez   zeltileri

Carrez I: 7,2 g çinko sülfat heptahidrat  ifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Carrez II: 3,4 g Potasyum hexasiyano ferrat (II) trihidrat  ifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Standart Stok   zeltiler

500 mg/L HMF standart stok çözeltisi, ultra saf su ile hazırlanmıştır.

Çalışma çözeltileri

200 mg/L'lik stok çözeltilerden 1, 2, 4 ve 8 mg/L'lik çalışma çözeltileri %10 asetonitril içeren ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.6.2 Analitik Koşullar

%90 tampon ve %10 asetonitril içeren karışım mobil faz olarak kullanılmıştır. DAD dedektör ile yapılan dalga boyu taramasında en yüksek pikin 285 nm'ye ait olduğu gözlemlenmiştir. Kolon fırını sıcaklığı 25 C ve enjeksiyon hacmi 20  L'dir.

2.2.6.3 Numunenin Hazırlanması

100 mL'lik ölçü balonu içine 2 g örnek tartılıp üzerine 1'er mL Carrez I ve Carrez II çözeltileri eklenerek %10 asetonitril içeren ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Ölçü balonu, ultrasonik banyoda 10 dakika tutulmuştur. Berrak kısımdan bir miktar alınıp 0,45 μ m'lik enjektör ucu filtresinden süzülerek vial e alınmıştır.

2.2.7 Şeker Analizi (glikoz, fruktoz, maltoz ve sükroz)

Şeker analizleri HPLC cihazında, AOAC (1979) yöntemine göre yapılmıştır. Örneklerde hem indirgen şeker (glikoz, fruktoz ve maltoz) hem de indirgen olmayan şekerlerden biri olan sükroz analizi yapılmıştır. Öğütülmüş örneklerden 5 g santrifüj tüpü içine tartılarak, üzerine 50 mL ultra saf su, 10 mL carrez I (7,2 g Çinko sülfat heptahidrat çifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmış) ve 10 mL carrez II (3,4 g Potasyum hekzasiyano ferrat(II)trihidrat çifte damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmış) solüsyonları eklenmiştir. Numuneler magnetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmış ve yüksek devirde santrifüj edildikten sonra berrak kısımdan alınarak 0,45 μ m'lik filtreden süzülerek HPLC'ye enjekte edilmiştir.

2.2.7.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Stok Çözeltisi

1 g standart madde ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmakta ve böylece %1'lik (10000 mg/L) stok çözelti hazırlanmış olmaktadır.

Çalışma Çözeltileri

Stok çözeltiden artan konsantrasyonlarda (%0,125, %0,25, %0,5 ve %1,0) glikoz, fruktoz, maltoz ve sükroz standartları ultrasafsu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.7.2 HPLC Şartları

Refractive Index RID-10A-Shimadzu dedektör ve Shodex NH₂-P (250mmx4,6mm) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz asetonitril (HPLC saflıkta) ve ultra saf su (75:25, v/v) kullanılarak hazırlanmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 30°C, enjeksiyon hacmi 10 μ L ve akış dakikada 1 mL'dir.

2.2.8 Protein Analizi

Protein analizleri AOAC (2006) yöntemine göre yapılmıştır. Öğütülmüş örnekten 0,25 g tartılarak, LECO FP 528 cihazında okuma yapılmıştır. Alüminyum folyolara 0,25 g örnek tartılmış ve cihazda %azot (N) olarak sonuç alınmıştır. Elde edilen değer hububatlarla ait değer olan 5,7 ile çarpılarak %protein sonucu cihaz tarafından otomatik olarak verilmiştir.

2.2.9 pH Analizi

Kahvelerin pH analizleri Murthy ve Manonmani (2009) önerdiği yönteme göre 20°C’de dijital pH-metre kullanılarak yapılmıştır. Kahvelerden 5 g tartılıp 50 mL sıcak saf su ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra 20°C’ye soğuması için bekletilmiştir. Akabinde, pH metre kullanılarak her bir örneğin pH’sı 3 paralel olacak şekilde tespit edilmiştir.

2.2.10 Kül Analizi

Kavrulmuş kahvenin kül miktarı TS 13423 (2010)’e göre belirlenmiştir. 5 g öğütülmüş kahve krozeye tartılmış ve sabit ağırlığa ulaşınca kadar 550°C’de yakılmıştır. Ardından, krozeler fırından çıkarılıp desikatör içinde soğumaya bırakılmış ve oda sıcaklığına gelince ağırlığı ölçülmüştür. Hesaplamalar Denklem 2.3’e göre yapılmıştır.

$$\%K\ddot{u}l = ((M_2-M_1)/M) \times 100 \quad (2.3)$$

M_2 =Yakmadan sonraki kroze+kül ağırlığı, M_1 =Sabit tartıma getirilen krozenin ağırlığı, M =Alınan örneğin ağırlığı

2.2.11 Suda Çözünen Madde Tayini

TS 13423 (2010)’e göre belirlenmiştir. Numuneden 2 g tartılıp, 250 mL’lik bir balona alınmış, üzerine 200 mL su ilave edilerek balon geri soğutucuya bağlanmıştır. Hafif bir alev üzerinde bir saat süre ile kaynatılmıştır. Sonra soğutulup süzgeç kâğıdından 250 mL’lik ölçülü balon içerisine süzölmüştür. Her seferinde 10-15 mL su kullanılarak süzgeç kâğıdı üç kez yıkanmıştır. Balondaki süzöntü, su ile 250 mL’ye seyreltilip, iyice çalkalanıp ve darası alınmış kapsüle pipetle 50 mL aktarılıp, su banyosunda kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Etüvde $103 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de bir saat kurutulup, desikatörde soğutulup ve tartılmıştır. Yeniden

etüvde aynı sıcaklıkta 30 dakika kurutulup, desikatörde soğutulup tartılmıştır. Etüvde kurutma, desikatörde soğutma ve tartma işlemleri, birbiri ardına yapılan iki tartım arasındaki fark 1 mg'dan az oluncaya kadar sürdürülmüştür. En düşük değer kaydedilmiştir. Hesaplamalar Denklem 2.4'e göre yapılmıştır.

$$SM = (50000 \times (m_2 - m_1)) / (m \times (100 - R)) \quad (2.4)$$

m_2 : Kapsülün, içindeki suda çözünen kuru madde ile birlikte kütlesi (g), m_1 : Boş kapsülün kütlesi (g), m : Deney için alınan numunenin kütlesi (g), R : Numunedeki rutubet muhtevası (kütlece yüzde olarak)

2.2.12 Nem Analizi

Nem analizleri; kahve (öğütülmüş) için TS 13423 (2010)'e göre yapılmıştır. Kavrulmamış yeşil kahveden ve kavrulmuş kahveden (öğütülmüş formda) 5 g örnek, sabit tartıma getirilmiş nem kaplarına tartılmıştır. Örnekler $103 \pm 2^\circ\text{C}$ 'deki etüvde sabit tartıma gelinceye 6 saat kurutulmuştur. Ağırlık değişimine dayanarak gravimetrik yöntemle örneklerin nem içeriği %(w/w) olarak hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.13 Renk Analizi

Kahve numunelerinde L^* , a^* , b^* renk değerleri renk tayin cihazı (Spectrophotometer CM-5 Konica Minolta, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Aynı örnek için 3 ayrı noktada ölçüm alınmıştır. L^* değeri 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değişirken a^* ve b^* değerleri -60 ve 60 arasında değişmektedir (Mizukami vd., 2014).

2.2.14 Aroma Analizi

Marin vd. (2008)'nin uyguladığı metod takip edilmiştir. Uçucu bileşenlerin tespitinde GC-QTOF-MS cihazı, izolasyon yöntemi olarak HS/SPME tekniği kullanılmıştır. Analiz sırasında, toz halindeki kahveden 20 mL'lik amber vial 0,6 g tartılmış, 10 mg/L konsantrasyonundaki cis-4-karen'den (iç standart) örneğin üzerine 120 μL eklenmiş ve vialin kapağı hızlıca kapatılmıştır. Öncelikle, vial 45°C 'deki ısıtıcı manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırılmış ve ardından vialin tepe boşluğuna SPME fiberi (50/30 μm DVB/CAR/PDMS)

daldırılarak 350 rpm'de 30 dakika bekletilerek tepe boşluğunda biriken uçucu bileşenlerin fiber üzerine absorbe edilmesi sağlanmıştır. Süre sonunda, vialden çıkarılan fiber GC-QTOF-MS cihazına 10 dakika boyunca enjekte edilmiştir.

Bileşiklerin LRI değerlerinin belirlenmesi için n-alkan (C₈-C₄₀) serisi aynı şartlarda cihaza verilmiştir. Standart çözeltilerin hazırlanmasında metanol kullanılmıştır.

Piklerin tanısı, standardı bulunan bileşikler için standart çözelti enjekte edilerek, standardı olmayan bileşikler için kütle spektrumunun bilgisayar hafızasındaki kütle spektrumlarıyla (Wiley, Oil-adams ve Nist) karşılaştırılarak yapılmıştır. İç standard yardımıyla miktar hesabı yapılmıştır.

2.2.14.1 GC-QTOF-MS Koşulları

Kahvelerdeki aroma bileşikleri gaz kromatografisi (Agilent 7890B, ABD) yardımıyla analiz edilmiştir. ZB-WAXms (30m×0,25mm×0,25µm) kolon kullanılmıştır. İnlet sıcaklığı 250°C ve akış hızının değeri 1,6 mL/dak'dır. Helyum (20 mL/dak) taşıyıcı gazı ve iyonlaştırma için EI tekniği kullanılmıştır. Source sıcaklığı 250°C, elektron enerjisi 70,0 eV, MS aralığı 20-260 m/z ve acquisition rate 2,0 spectra/s'dir. Sıcaklık programı; 40°C'de 5 dakika bekleme ve 40°C'den 180°C'ye dakikada 3°C ve 180°C'den 250°C'ye dakikada 10°C artacak ve 250°C'de 5 dakika sabit kalacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir örnek için gaz kromatografisine 3 enjeksiyon yapılmıştır ve toplam analiz süresi 64 dakikadır.

2.2.14.2 Aroma Bileşiklerinin Miktarlarının Hesaplanması

Doğrudan enjeksiyonla belirlenen aroma maddelerinin konsantrasyonları Denklem 2.5 kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar µg/kg (örnek) cinsinden verilmiştir (Kelly vd., 1999).

$$C_i = (A_i/A_{st}) \times C_{st} \times RF \quad (2.5)$$

C_i: Bileşiğin Konsantrasyonu (µg/kg), A_i: Bileşiğin Pik Alanı, A_{st}: İç Standardın Pik Alanı, C_{st}: İç Standardın Konsantrasyonu (2000 µg/kg), RF: Cevap Faktörü (1 olarak alınmıştır)

2.2.14.3 Alıkonma İndeksi

Gaz kromatografide, Kovats tarafından oluşturulmuş alıkonma indeksi alıkonma sürelerini (retention time) sistemden bağımsız bir sabit haline dönüştürmek için kullanılmaktadır. Maddeleri belirlerken alıkonma süreleri baz alınarak yapılan yaklaşımlarda karşılaşılan en büyük problem kromatografik koşulların aynı şekilde korunmasını sağlamaya çalışmaktır çünkü sıcaklığın ya da taşıyıcı gazın basıncının değişmesi alıkonma sürelerinde ciddi sapmalara neden olabilmektedir (Dr. Hochmuth, 2019).

Bir analitin alıkonma indeksi, analit pikini iki veya daha fazla normal alkan piki ile kıyaslayarak bulunmaktadır. Bir normal alkanın alıkonma indeksi, içerdiği karbon atomları sayısının 100 katıdır ve kromatografik koşullardan bağımsızdır (Beşergil, 2019). Linear alıkonma indeksi Denklem 2.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LRI = 100 \times n + 100 \times (m - n) \times ((T_U - T_n) / (T_N - T_n)) \quad (2.6)$$

LRI=Bilinmeyen maddeye ait kovats alıkonma indeksi, T_U =Analiz edilen örneğe ait alıkonma zamanı, T_n =Numuneden önceki alkanın çıkış zamanı, T_N =Numuneden sonraki alkanın çıkış zamanı, m =Numuneden sonra ayrılan alkanın C sayısı, n = Numuneden önce ayrılan alkanın C sayısı

2.2.15 Duyusal Analiz

Bressanello vd. (2017)'nin kullandığı yöntemle göre yapılmıştır. Bursa Gıda ve Yem Merkez Araştırma Enstitüsü'nden 8 panelist seçilmiştir. Amerika Nitelikli Kahve Birliği (SCAA) protokolüne göre pişirilmiş Türk kahvesinde (5g/65 mL) 2 aşamada duyusal analiz (lezzet profili analizi) gerçekleştirilmiştir:

- 1)Hazırlandıktan 3 dakika sonra pişirilen kahvenin aromasının koklayarak değerlendirilmesi
- 2) Bir fincan kahvenin kalitesinin tad (karamel/tatlı, meyvemsi, kavrulmuş, yanık/dumansı), aroma, acılık ve genel izlenim açısından değerlendirilmesi

Kahve örneklerinin duyusal özellikleri 1-10 ölçeğinde değerlendirilmiştir.

2.2.16 İstatiksel Analiz

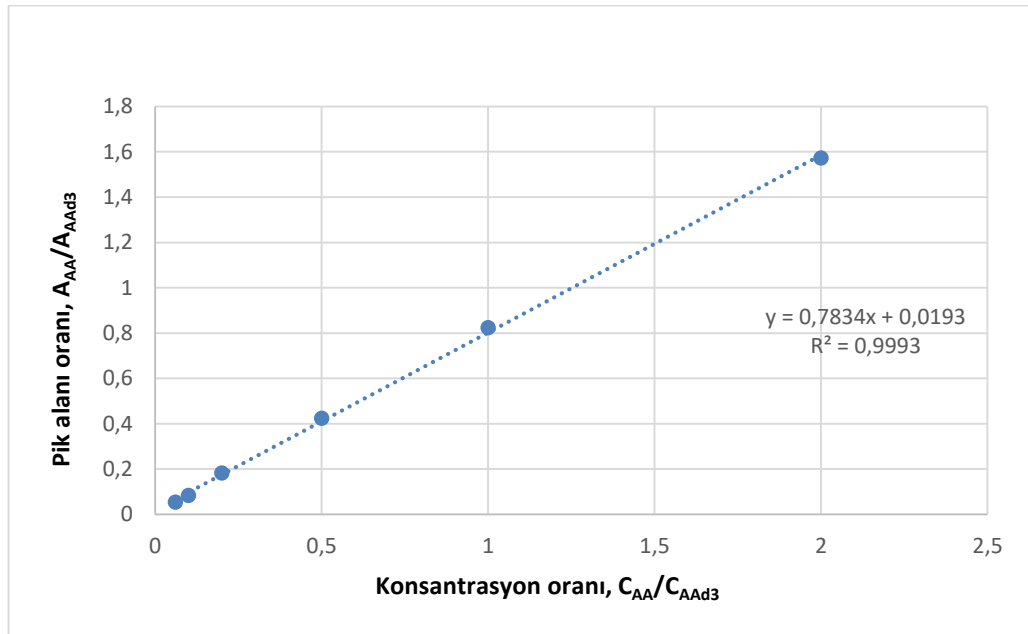
Sonuçlar SPSS 21 paket (IBM SPSS Statistics 21) programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasında belirli bir değişkene bağlı olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla tek faktörlü varyans analizi (One-way-ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Anlamlı fark bulunduğu zaman bu farkın hangi gruplar arasındaki farktan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Duncan testi (Post-hoc analizi) uygulanmıştır. Bu analizlerde %95 güven seviyesi ($p < 0,05$) dikkate alınmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonun belirlenebilmesi için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon analizinde %95 ve %99 güven seviyeleri ($p < 0,05$; $p < 0,01$) dikkate alınmıştır.

Asparaginaz enzimi uygulaması için çalışmanın planlaması (merkezi karma tasarım), elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ve optimum noktaların belirlenmesinde Design-Expert 7.0.0 (USA) programı yüzey yanıt yöntemi (Response Surface Method, RSM) kullanılmıştır.

3.1 LC-MS/MS’de Akrilamid Analiz Yönteminin Validasyonu

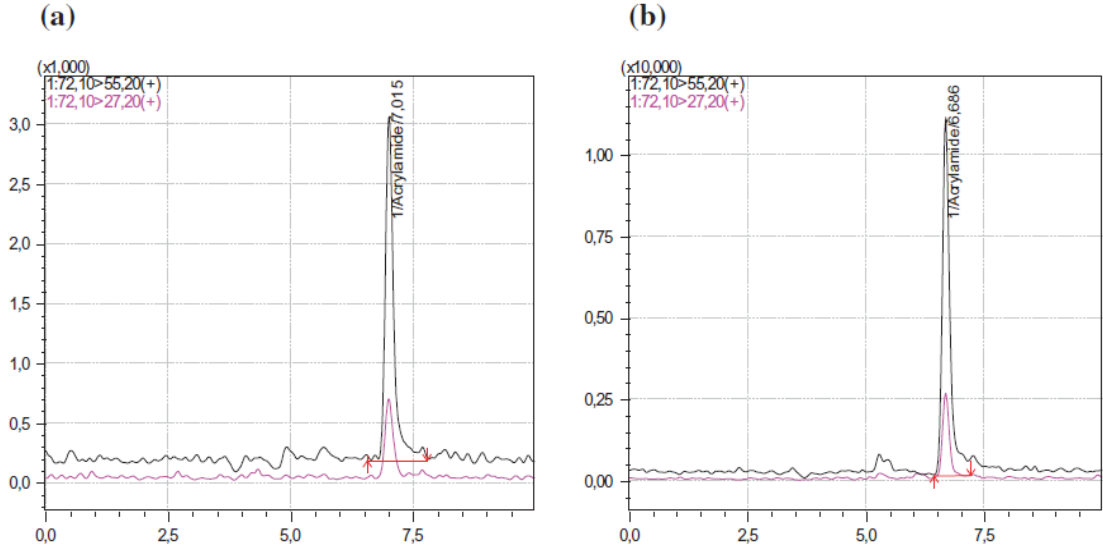
3.1.1 Doğrusallığın Belirlenmesi

Lineer regresyon analizine göre kalibrasyon eğrisinin 30-1.000 $\mu\text{g/kg}$ aralığında yüksek determinasyon katsayısına ($R^2=0,999$) sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 3.1). İç standart hesaba katılmadığında determinasyon katsayısının 0,918 olduğu görülmüştür, bu durum iç standart eklemenin miktarsal analizin doğruluğunu artırdığını göstermektedir.



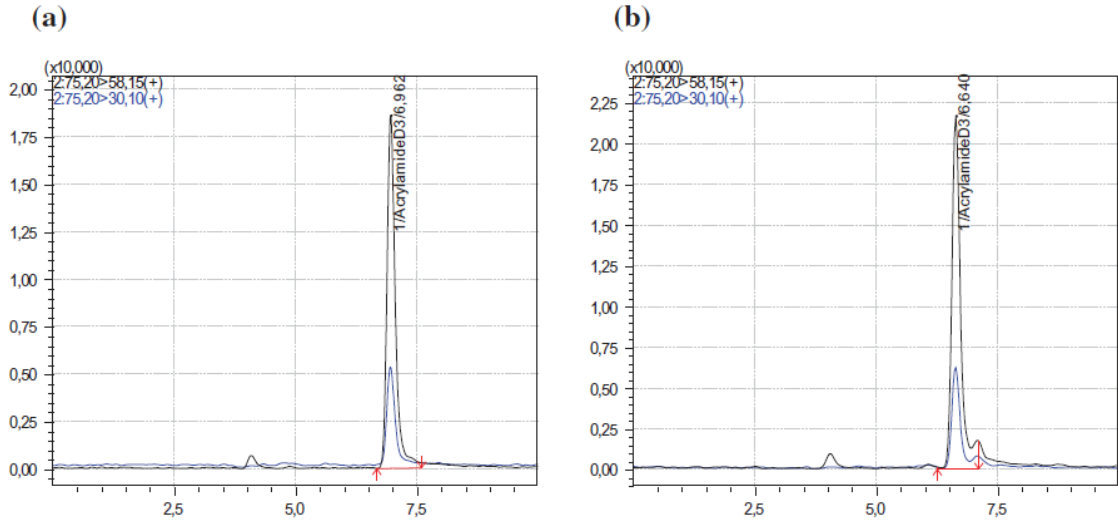
Şekil 3.1 Akrilamid (AA) ve Akrilamid- d_3 (AAd₃) ile kirletilen yeşil kahve çekirdeklerine ait kalibrasyon grafiği

Akrilamid ile kirletilmiş (100 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde) yeşil kahve çekirdeğine (a) ve Türk kahvesine (b) ait kromatogram Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2 100 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde akrilamid ile kirletilmiş öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğinde (a) ve Türk kahvesi örneğinde (b) akrilamid yavru iyonlarına (m/z: 55,20 ve 27,20) ait kromatogramlar

Akrilamid- d_3 ile kirletilmiş (100 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde) yeşil kahve çekirdeğine (a) ve Türk kahvesine (b) ait kromatogram Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3 100 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde akrilamid- d_3 ile kirletilmiş öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğinde (a) ve Türk kahvesi örneğinde (b) akrilamid yavru iyonlarına (m/z: 58,15 ve 30,10) ait kromatogramlar

Şekil 3. 2 ve 3. 3'te görüldüğü üzere a ve b sekmesinde yer alan kromatogramların alıkonma zamanları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu durumun nedeni, kahvenin yüksek miktarda matriks girişimi yapan maddeler içermesidir (Rood, 1998). Dolayısıyla, ekstraksiyon aşamasında her ne kadar temizleme (clean-up) işlemi uygulansa da kahvrulmuş kahvenin matriksinde bulunan yağ ve pigment molekülleri tamamen uzaklaştırılamamıştır.

3.1.2 Yöntemin Saptama Sınırı ve Ölçme Sınırının Belirlenmesi

Akrilamid analizi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,6 ve 15,5 $\mu\text{g/kg}$ olarak tespit edilmiştir.

3.1.3 Kesinliğin Belirlenmesi

Akrilamid analiti için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerlerinin (%RSD) 3,7 ve 7,6 olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, %20'nin altında olduğu için kabul edilebilir değerlerdir (Lee vd., 2015).

3.1.4 Geri Kazanım Yüzdesinin Belirlenmesi

Yöntemin geri kazanım yüzdesinin %99,7 olduğu bulunmuştur.

3.2 Piyasadan Toplanan Kahve Örnekleri için Analiz Bulguları

3.2.1 Kahve Örneklerinin Akrilamid Miktarları

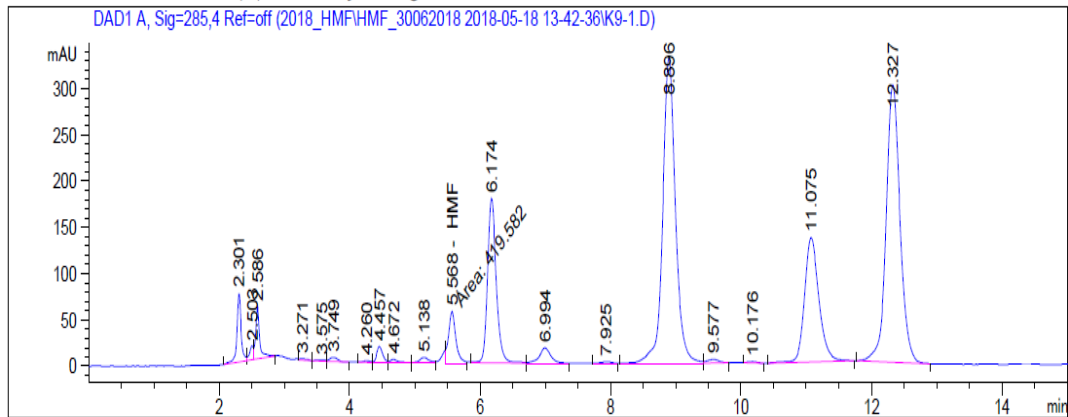
Bu çalışma ile dibek ve menengiç kahvelerinin akrilamid seviyeleri ilk defa belirlenmiştir. Türk kahvesi örneklerinin akrilamid seviyesi ise ilk defa bu kadar kapsamlı olarak incelenmiştir. Toplam 36 kahve örneğinde (20 Türk kahvesi, 8 dibek, 8 menengiç) akrilamid analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklere ait akrilamid analizi sonuçları Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir. Analiz edilen kahve örneklerinin akrilamid miktarının $31,1 \pm 0,6$ ile $323,4 \pm 5,4$ $\mu\text{g/kg}$ arasında değiştiği saptanmıştır. En yüksek ortalama akrilamid seviyesi menengiç kahvesinde ($240,3$ $\mu\text{g/kg}$) bulunurken bunu Türk kahvesi ($204,3$ $\mu\text{g/kg}$) ve dibek kahvesi ($78,6$ $\mu\text{g/kg}$) izlemiştir. Kahvelerin akrilamid seviyeleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Türk kahvesi örneğinde benzer sonuçları sunan başka çalışmalarda gerçekleştirilmiştir. Ölmez vd. (2008) tarafından piyasada satılan 4 Türk kahvesi örneğinde akrilamid taraması yapılmış ve akrilamid seviyesinin 200 ile 336 $\mu\text{g/kg}$ arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Tawfik ve El-Ziney (2008) markette satılan kavrulmuş Türk kahvelerinin ortalama akrilamid seviyesinin 282 $\mu\text{g/kg}$ olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada bu değer 170-351 $\mu\text{g/kg}$ aralığında olduğu tespit edilmiştir (Friedman, 2003).

Dibek ve menengiç kahvelerinin akrilamid seviyeleri ilk defa bu çalışmayla belirlenmiş olsa da kahve ikame maddelerinin akrilamid seviyelerini belirlemek amacıyla yapılmış çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır (EFSA 2012; Mojska ve Gielecinska 2013). Yapılan bu çalışmalarda, kahve ikamelerinin akrilamid seviyelerinin diğer kahve ürünlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

3.2.2 Kahve Örneklerinin HMF Miktarları

Türk kahvesi örneklerinin HMF miktarının 168,9 mg/kg ile 353,5 mg/kg arasında değiştiği ve ortalama 260,5 mg/kg seviyesinde HMF içerdiği belirlenmiştir (Tablo 3.1). Bu değerler, daha önce yapılan başka çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Murkovic ve Bornik, 2007; Arribas-Lorenzo ve Morales, 2010; Capuano ve Fogliano, 2011). Tablo 3.2’de belirtildiği üzere dibek kahvelerinin ortalama HMF seviyesi Türk kahvesinden daha düşüktür. Menengiç kahvesinin, kahveler arasında en düşük HMF konsantrasyonuna (23,82-37,66 mg/kg) sahip olan kahve olduğu saptanmıştır (Tablo 3.3). Kahvelerinin HMF seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 3.4 Türk kahvesi örneğine (9 kod numaralı) ait HMF kromatogramı

3.2.3 Kahve Örneklerinin Protein Oranları

Türk kahvesi örneklerinin protein değerlerinin %9,60-17,06 arasında değiştiği (Tablo 3.1) ve ortalama protein değerinin %15,23 olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Barter (2004) kavrulmuş kahvenin protein değerini %13 olarak bulmuştur. Dibek kahvesinin protein seviyesinin Türk kahvesine göre daha düşük olduğu ve %4,18-11,90 aralığında (ortalama %7,3) değiştiği görülmüştür (Tablo 3.2). Menengiç kahvelerinin ise ortalama %9,27 seviyesinde protein içerdiği belirlenmiştir (Tablo 3.3). Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kahve örneklerinin protein değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

3.2.4 Kahve Örneklerinin Şeker Oranları

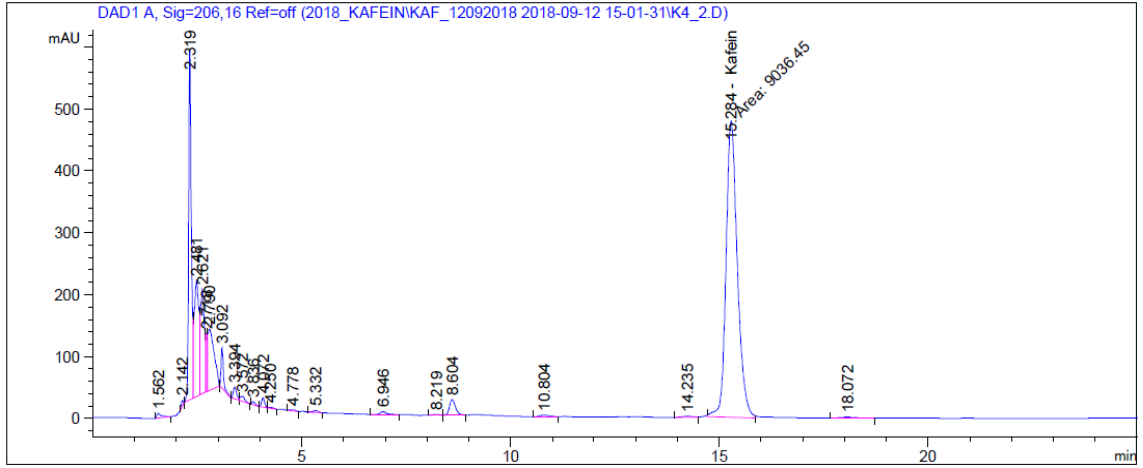
Türk kahvesi örneklerinin düşük seviyede glikoz (%TE-0,32) ve fruktoz (%0,03-0,16) nispeten daha yüksek miktarda ise sükroz (%0,17-1,06) içerdiği saptanmıştır. Türk kahvesindeki toplam indirgen şeker miktarının %0,03-0,39 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.1). Benzer şekilde, Knopp vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada kuru şekilde işlenen (dry processed) yeşil kahve çekirdeklerinin glikoz miktarının %0,23 olduğu bulunmuştur. Türk kahvesinde bulunan fruktoz değeri ise Kroeplien (1974)'nin bulgularıyla uyumluluk göstermektedir. Sükrozun yeşil kahvedeki temel karbonhidrat olduğu bilinmektedir (Prodolliet vd., 1995; Murkovic ve Derler, 2006).

Dibek kahvesinin glikoz miktarının Türk kahvesine oranla daha yüksek olduğu (%0,52-1,67) saptanmıştır (Tablo 3.2). Bu durumun, dibek kahvesi üretiminde tat vermesi için eklenen ekstra maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dibek kahvesinin fruktoz seviyesinin ise %TE-0,54 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Dibek kahvesindeki toplam indirgen şeker miktarının %0,52-1,77 değerleri arasında; sükroz konsantrasyonunun ise %0,32-1,67 değerleri arasında değiştiği görülmüştür.

Menengiç kahvesinde glikoz, fruktoz ve maltoz tespit edilmemiştir. Menengiç kahvesinin sükroz şekeri miktarının %0,11-0,28 değerleri aralığında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.3).

3.2.5 Kahve Örneklerinin Kafein Oranları

Türk kahvesinin kuru maddesinde bulunan kafein miktarının %1,00-1,93 aralığında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.4). Bulunan bu değerler, Türk Gıda Kodeksi Kahve ve Kahve Ekstraktları Tebliğinde kafein için belirlenen yasal kriterle (kuru madde esasından ağırlıkça en az %1) uygunluk göstermektedir. Dibek kahvesinde bulunan kafein miktarının (%0,14-0,81) Türk kahvesine oranla daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 3.5). Tablo 3.6’da belirtildiği üzere, menengiç kahvesinde kafein saptanmamıştır. Benzer şekilde, Seçilmiş vd. (2015) menengiç kahvesini kafein içermeyen bitkisel bir kahve alternatifi olarak tanımlamışlardır. Kahve örneklerinin kafein değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 3.5 Türk kahvesi örneğine (4 kod numaralı) ait kafein kromatogramı

3.2.6 Kahvelerin Nem Oranları

Türk kahvesi örneklerinin nem oranları %1,30-3,87 aralığında bulunmuş (Tablo 3.4), ortalama nem değeri %1,89 olarak hesaplanmıştır. Bulunan nem oranları, Tebliğ’de belirtilen ağırlıkça en çok %5 olmalı kriterine uymaktadır. Dibek kahvesinin nem oranlarının %2,16-3,75 aralığında, menengiç kahvesinin ise %0,84-1,66 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.5 ve 3.6).

3.2.7 Kahve Örneklerinin pH Değerleri

Türk kahvesinin pH değerinin 4,93 ile 6,41 arasında; Dibek kahvesinin ise 5,55-7,04 arasında değiştiği görülmüştür (Tablo 3.4 ve 3.5). Menengiç kahvesinin pH

değerinin (5,23-5,46) ise diğer kahve gruplarına göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 3.6).

3.2.8 Kahve Örneklerinin Kül Oranları

Kuru madde üzerinden yapılan hesaplamada Türk kahvesinin kül oranı %3,10 ile 4,94 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.4). Bulunan bu değerler, yasal limitlerle (%3,0-6,0) uygunluk göstermektedir. Tablo 3.5’de gösterildiği üzere dibek kahvesinin kül miktarı kuru maddede %2,59 ile 4,09 değerleri arasında değişmiştir. Menengiç kahvesinin ise kuru maddede kül miktarının %2,50 ile 3,87 arasında olduğu bulunmuştur (Tablo 3.6).

3.2.9 Kahve Örneklerinin Suda Çözünen Madde Oranları

Türk kahvesi örneklerinin kuru maddede suda çözünen madde oranlarının %21,91 ile 47,33 arasında, dibek kahvesinde ise %57,95-94,50 arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.4 ve 3.5). Menengiç kahvesinde ise suda çözünen madde oranının kuru maddede %9,91-11,01 olduğu bulunmuştur (Tablo 3.6).

3.2.10 Kahve Örneklerinin Kuru Madde Oranları

Türk kahvesi örneklerinin kuru madde oranları %96,13-98,80 aralığında, dibek kahvesinin %96,23-97,83 aralığında olduğu saptanmıştır (Tablo 3.4 ve 3.5). Menengiç kahvesinin kuru madde oranının ise %98,41-99,45 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.6).

3.2.11 Kahve Örneklerinin Renk Değerleri (L^* , a^* , b^*)

Tablo 3.3 görüldüğü üzere Türk kahvelerinin L^* , a^* ve b^* değerlerinin sırasıyla 40,73-46,72; 5,91-8,38 ve 6,05-12,01 aralığında değiştiği bulunmuştur. L^* değerine göre Türk kahvelerinin orta kavrulmuş olduğu belirlenmiştir. Dibek kahvesinin L^* değerinin 49,52-65,75 aralığında, a^* değerinin 5,61-7,70 aralığında ve b^* değerinin 9,61-13,85 aralığında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.4). Koyu renkte ve püre formunda olan Menengiç kahvesinin L^* , a^* ve b^* değerlerinin sırasıyla 28,96-29,49; 2,14-2,39 ve 1,86-2,27 aralığında olduğu hesaplanmıştır (Tablo 3.5). Kahve örneğinin rengi koyulaştıkça L^* , a^* ve b^* değerlerinin azaldığı

saptanmıştır. Benzer şekilde, Jakanović vd. (2012) kahveler kavruldukça L^* , a^* ve b^* değerinin düştüğünü belirlemişlerdir.

3.2.12 Akrilamid Seviyesi ile Diğer Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

Şimdiye değin Türk kahvesinin akrilamid konsantrasyonu ile bazı fiziko-kimyasal özellikleri arasındaki korelasyonları inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, örneklerin akrilamid konsantrasyonu ile protein, şeker, HMF, nem, pH, suda çözünen madde, kül, kafein, kuru madde ve renk değerleri arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon testi ile araştırılmıştır.

Türk kahvesi örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ile HMF değerleri arasında, pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($r=0,698$, $p<0,01$) bulunmuştur. Yani örneklerden akrilamid değeri fazla olanın, HMF konsantrasyonu da yüksek bulunmuştur. Bu durumun altında yatan nedenin, her iki bileşiğinde Maillard reaksiyonunun ürünü olması olduğu düşünülmektedir (Akıllıoğlu ve Gökmen 2014). Miao vd. (2014) yaptığı bir çalışmada patates cipsinde akrilamid ve HMF oluşumu arasında pozitif ilişki olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde, dibek ve menengiç kahvelerinin akrilamid ve HMF konsantrasyonları arasında güçlü pozitif korelasyonlar ($r=0,932$, $p<0,01$ ve $r=0,957$, $p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir.

Türk kahvesi örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ile glikoz, fruktoz ve toplam indirgen şeker konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Türk kahvelerinin akrilamid ile sükroz miktarları arasında, pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($r=0,503$, $p<0,01$) bulunmuştur. Bulunan bu sonuçlar, kahvede akrilamid oluşumunda sınırlayıcı faktörün indirgen şekerler olmadığı bulgusunu desteklemektedir (Bagdonaite vd., 2008). Ayrıca, Kocadağlı vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada sükroz dekompozisyonu ile oluşan neo-karbonillerin kahvede akrilamid oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Dibek kahvesi örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ile glikoz ve fruktoz konsantrasyonları arasında önemli bir korelasyon bulunamamıştır. Dibek kahvesinin toplam indirgen şeker ve akrilamid miktarı arasında zayıf pozitif korelasyon ($r=0,496$, $p<0,05$) olduğu saptanmıştır. Dibek kahvesinin akrilamid ve sükroz konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($r=0,707$, $p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Yine benzer

şekilde, menengiç kahvesinin akrilamid ve süktroz konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,604$, $p<0,01$) olduğu belirlenmiştir.

Kahve örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ile protein değerleri arasında ve yine akrilamid konsantrasyonu ile pH değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($p>0,05$; $p>0,01$).

Türk kahvesi örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ve kafein değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamışken, dibek kahvesinin akrilamid konsantrasyonu ile kafein değerleri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon ($r=0,473$, $p<0,05$) bulunmuştur. Bu pozitif ilişki beklenen bir sonuçtur çünkü kafein ve akrilamid seviyesi kavurma işleminden benzer şekilde etkilenmekte ve kavurma süresi arttıkça kafein miktarı azalmaya başlamaktadır (Wanyika vd., 2010).

Kahvelerin akrilamid miktarı ile kül, suda çözünen madde, nem ve kuru madde miktarları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$; $p>0,01$).

Renk analizleri sonuçlarına göre Türk kahvesinin akrilamid seviyesi ile L^* değerleri arasında düşük pozitif korelasyon ($r=0,292$, $p<0,05$) saptanmıştır. Benzer şekilde, Summa vd. (2007) fazla kavru lan yani L^* değeri düşük olan kahvelerin akrilamid miktarının daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Öte yandan, dibek kahvesi örneklerinin akrilamid konsantrasyonu ile L^* değerleri arasında, negatif yönde anlamlı bir korelasyon ($r=-0,504$, $p<0,05$) bulunmuştur. Bu negatif korelasyonun nedeninin dibek kahvesinin içine katılan açık renkli maddeler olduğu düşünülmektedir. L^* değeri en düşük olan menengiç kahvesinin akrilamid seviyesinin en düşük olmadığı görülmüştür. Bu durumun menengiç kahvesi ve Türk kahvesi üretiminde farklı hammaddelerin (çekirdeklerin) kullanılması ve üretim proseslerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Türk ve menengiç kahvelerinin akrilamid konsantrasyonu ile a^* ve b^* değerleri arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmemişken dibek kahvesinin a^* değeri ile akrilamid konsantrasyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($r=0,588$, $p<0,01$) saptanmıştır. Benzer şekilde, Pedreschi vd. (2005) patates cipslerinin a^* değerleri ve akrilamid konsantrasyonları arasında pozitif ilişki bulmuştur.

Tablo 3.1 Türk kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz, toplam indirgen şeker ve sükroz değerleri^a

Örnek no	Akrilamid ($\mu\text{g/kg}$)	HMF (mg/kg)	Protein (%w/w)	Glikoz (g/100g)	Fruktoz (g/100g)	Toplam indirgen şeker (g/100g)	Sükroz (g/100g)
1	154,43 ⁱ ± 7,67	210,18 ⁱ ± 8,40	16,42 ^e ± 0,07	T.E. ^b	0,10 ^{def} ± 0,01	0,10 ^{bcd} ± 0,01	0,37 ^g ± 0,01
2	131,12 ^j ± 3,42	185,25 ^j ± 3,88	17,06 ^a ± 0,38	T.E.	0,09 ^{efg} ± 0,01	0,09 ^{bc} ± 0,01	0,23 ^j ± 0,01
3	158,95 ⁱ ± 5,12	222,45 ^h ± 6,27	16,46 ^e ± 0,08	T.E.	0,10 ^{df} ± 0,01	0,10 ^{bcd} ± 0,01	0,36 ^g ± 0,01
4	218,37 ^{de} ± 5,11	273,09 ^d ± 4,10	16,07 ^h ± 0,07	T.E.	0,12 ^{bc} ± 0,02	0,12 ^{fg} ± 0,01	0,21 ^j ± 0,01
5	193,07 ^f ± 7,45	260,52 ^f ± 0,92	16,62 ^{cd} ± 0,05	T.E.	0,12 ^{bc} ± 0,01	0,12 ^{fg} ± 0,02	0,28 ⁱ ± 0,01
6	155,38 ⁱ ± 3,06	220,39 ^h ± 2,08	16,30 ^f ± 0,05	T.E.	0,10 ^{def} ± 0,01	0,10 ^{bcd} ± 0,01	0,38 ^g ± 0,01
7	182,76 ^g ± 4,10	222,57 ^h ± 2,34	16,70 ^{bc} ± 0,03	T.E.	0,11 ^{bcd} ± 0,01	0,11 ^{defg} ± 0,01	0,17 ^k ± 0,01
8	215,57 ^e ± 1,55	272,10 ^d ± 5,52	9,60 ^ö ± 0,07	0,20 ^b ± 0,01	0,05 ⁱ ± 0,01	0,25 ^{ij} ± 0,02	1,01 ^b ± 0,01
9	276,35 ^{ab} ± 7,10	330,40 ^b ± 4,12	16,21 ^g ± 0,03	T.E.	0,09 ^{fgh} ± 0,01	0,09 ^b ± 0,01	0,98 ^c ± 0,03
10	218,73 ^{de} ± 5,91	353,47 ^a ± 8,57	15,89 ⁱ ± 0,05	T.E.	0,03 ^j ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,56 ^f ± 0,01
11	252,07 ^c ± 2,82	318,59 ^c ± 3,26	14,71 ^l ± 0,07	0,32 ^a ± 0,01	0,07 ^{gh} ± 0,01	0,39 ^k ± 0,02	1,05 ^a ± 0,01
12	270,10 ^b ± 1,99	270,55 ^{de} ± 7,80	16,61 ^{cd} ± 0,06	T.E.	0,10 ^{def} ± 0,01	0,10 ^{bcd} ± 0,01	0,32 ^h ± 0,01
13	160,02 ⁱ ± 0,17	245,67 ^g ± 6,43	15,47 ^j ± 0,07	T.E.	0,11 ^{cde} ± 0,01	0,11 ^{bcd} ± 0,01	0,56 ^f ± 0,02
14	190,63 ^f ± 4,02	275,00 ^d ± 2,00	11,52 ⁿ ± 0,06	0,14 ^d ± 0,01	0,12 ^{bc} ± 0,01	0,27 ^j ± 0,01	1,06 ^a ± 0,01
15	225,13 ^d ± 1,02	246,40 ^g ± 6,41	14,52 ^m ± 0,05	0,10 ^e ± 0,01	0,15 ^a ± 0,01	0,25 ^{ij} ± 0,01	0,84 ^e ± 0,01
16	216,30 ^e ± 4,49	272,37 ^d ± 4,99	16,58 ^d ± 0,04	T.E.	0,12 ^{bc} ± 0,01	0,12 ^{efg} ± 0,01	0,22 ^j ± 0,01

17	197,10 ^f ± 5,56	267,31 ^{def} ± 5,73	16,76 ^b ± 0,05	T.E.	0,13 ^{bc} ± 0,01	0,13 ^g ± 0,01	0,28 ⁱ ± 0,01
18	174,73 ^h ± 4,41	262,47 ^{ef} ± 6,36	16,14 ^{gh} ± 0,04	T.E.	0,11 ^{cd} ± 0,01	0,11 ^{cdefg} ± 0,01	0,18 ^k ± 0,01
19	212,47 ^e ± 5,85	168,93 ^k ± 2,90	9,74 ^o ± 0,06	0,17 ^c ± 0,02	0,07 ^h ± 0,01	0,24 ⁱ ± 0,01	1,02 ^b ± 0,01
20	283,00 ^a ± 3,21	331,27 ^b ± 3,86	15,25 ^k ± 0,06	T.E.	0,16 ^a ± 0,02	0,16 ^h ± 0,02	0,94 ^d ± 0,02

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ortalama±Standart sapma (SD), n=3).

^bTespit Edilemedi.

Tablo 3.2 Dibek kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz, toplam indirgen şeker ve süktroz değerleri^a

Örnek no	Akrilamid (µg/kg)	HMF (mg/kg)	Protein (%w/w)	Glikoz (g/100g)	Fruktoz (g/100g)	Toplam indirgen şeker (g/100g)	Süktroz (g/100g)
1	106,83 ^c ± 3,12	146,37 ^c ± 1,28	6,22 ^d ± 0,13	1,13 ^c ± 0,10	0,54 ^a ± 0,02	1,67 ^b ± 0,11	1,67 ^a ± 0,03
2	134,44 ^b ± 4,30	162,91 ^b ± 3,53	9,52 ^b ± 0,37	0,73 ^d ± 0,05	0,03 ^d ± 0,01	0,53 ^d ± 0,04	1,20 ^b ± 0,05
3	169,46 ^a ± 3,68	242,25 ^a ± 3,76	6,10 ^d ± 0,11	1,67 ^a ± 0,05	0,11 ^b ± 0,01	1,77 ^a ± 0,04	0,62 ^e ± 0,01
4	31,12 ^f ± 0,57	47,16 ^f ± 4,24	4,18 ^f ± 0,05	1,27 ^b ± 0,10	0,06 ^c ± 0,01	1,29 ^c ± 0,04	0,32 ^g ± 0,01
5	42,41 ^e ± 1,27	106,47 ^d ± 2,78	5,39 ^e ± 0,07	1,22 ^{bc} ± 0,03	0,10 ^b ± 0,01	1,32 ^c ± 0,03	0,45 ^f ± 0,01
6	77,57 ^d ± 2,87	162,85 ^b ± 4,91	6,21 ^d ± 0,13	0,69 ^d ± 0,02	0,03 ^d ± 0,01	0,72 ^d ± 0,02	0,96 ^c ± 0,06
7	33,55 ^f ± 1,17	46,82 ^f ± 2,38	8,94 ^c ± 0,37	0,57 ^e ± 0,03	T.E.	0,57 ^e ± 0,03	0,65 ^{de} ± 0,07
8	33,69 ^f ± 1,77	53,43 ^e ± 0,80	11,90 ^a ± 0,10	0,52 ^e ± 0,03	T.E.	0,52 ^e ± 0,03	0,72 ^d ± 0,09

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ort±SD, n=3).

Tablo 3.3 Menengiç kahvelerinde belirlenen akrilamid, HMF, protein, glikoz, fruktoz, toplam indirgen şeker ve süktroz değerleri^a

Örnek no	Akrilamid ($\mu\text{g/kg}$)	HMF (mg/kg)	Protein (% w/w)	Glikoz (g/100g)	Fruktoz (g/100g)	Toplam indirgen şeker (g/100g)	Süktroz (g/100g)
1	154,67 ^g ± 3,91	23,82 ^f ± 0,13	9,15 ^b ± 0,41	T.E.	T.E.	T.E.	0,11 ^f ± 0,01
2	165,00 ^f ± 2,57	24,48 ^e ± 0,15	9,31 ^b ± 0,05	T.E.	T.E.	T.E.	0,27 ^a ± 0,02
3	323,40 ^a ± 5,40	36,36 ^b ± 0,13	9,25 ^b ± 0,24	T.E.	T.E.	T.E.	0,28 ^a ± 0,01
4	307,17 ^b ± 4,26	34,13 ^c ± 0,10	8,45 ^c ± 0,07	T.E.	T.E.	T.E.	0,26 ^a ± 0,01
5	320,00 ^a ± 2,88	37,66 ^a ± 0,16	10,32 ^a ±0, 14	T.E.	T.E.	T.E.	0,23 ^c ± 0,01
6	197,27 ^e ± 2,79	26,22 ^d ± 0,11	9,06 ^b ± 0,15	T.E.	T.E.	T.E.	0,12 ^e ± 0,01
7	209,37 ^d ± 1,76	26,08 ^d ± 0,25	9,38 ^b ± 0,09	T.E.	T.E.	T.E.	0,15 ^d ± 0,02
8	245,20 ^c ± 6,21	34,03 ^c ± 0,06	9,22 ^b ± 0,11	T.E.	T.E.	T.E.	0,22 ^b ± 0,02

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ort±SD, n=3).

Tablo 3.4 Türk kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri^a

Örn. no	Kafein (%)	Kuru madde (%)	Nem (%w/w)	pH	Kül (%)	Suda çözünen madde (%)	Renk Parametreleri		
							<i>L</i>	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]
1	1,37 ^b ± 0,10	97,1 ^f ± 0,01	1,65 ⁱ ± 0,04	5,02 ^{ef} ± 0,02	4,72 ^b ± 0,06	24,03 ^{cd} ± 0,08	41,56 ^h ± 0,69	6,87 ^f ± 0,07	7,66 ^g ± 0,14
2	1,39 ^b ± 0,06	98,2 ^{bc} ± 0,01	1,76 ^h ± 0,03	5,12 ^{de} ± 0,01	4,93 ^a ± 0,03	21,91 ^a ± 0,66	41,76 ^{gh} ± 0,12	6,31 ^h ± 0,06	6,72 ^h ± 0,17
3	1,35 ^b ± 0,10	98,3 ^{ab} ± 0,01	1,67 ⁱ ± 0,02	5,14 ^d ± 0,02	4,59 ^c ± 0,07	22,95 ^{abc} ± 0,95	42,42 ^{efg} ± 0,07	7,14 ^e ± 0,08	8,16 ^f ± 0,17
4	1,30 ^{bc} ± 0,05	98,4 ^{ab} ± 0,01	1,45 ^m ± 0,04	5,00 ^{hi} ± 0,02	4,47 ^{de} ± 0,05	24,89 ^{de} ± 0,59	41,17 ^{hi} ± 0,06	6,12 ⁱ ± 0,05	6,27 ⁱ ± 0,07

5	1,33 ^{bc} ± 0,10	97,8 ^{cde} ± 0,01	1,52 ^l ± 0,02	5,05 ^{fgh} ± 0,01	4,42 ^e ± 0,04	22,51 ^{ab} ± 0,12	42,34 ^{fg} ± 0,03	6,70 ^g ± 0,08	7,77 ^g ± 0,07
6	1,36 ^b ± 0,04	98,1 ^{bc} ± 0,01	1,65 ^{ij} ± 0,02	5,04 ^{fghi} ± 0,01	4,56 ^{cd} ± 0,05	22,64 ^{ab} ± 0,97	42,41 ^{efg} ± 0,05	6,89 ^f ± 0,04	7,96 ^{fg} ± 0,05
7	1,29 ^{bc} ± 0,05	98,0 ^{bcd} ± 0,01	1,35 ⁿ ± 0,04	5,22 ^c ± 0,02	4,72 ^b ± 0,04	30,69 ^g ± 1,02	40,73 ⁱ ± 0,19	5,91 ^j ± 0,13	6,04 ⁱ ± 0,08
8	1,01 ^d ± 0,04	97,1 ^f ± 0,01	2,24 ^c ± 0,04	6,39 ^a ± 0,01	4,19 ^{gh} ± 0,05	36,91 ^h ± 0,66	44,45 ^c ± 0,48	7,50 ^d ± 0,10	9,92 ^c ± 0,22
9	1,22 ^c ± 0,03	98,3 ^{ab} ± 0,01	1,66 ⁱ ± 0,03	4,99 ⁱ ± 0,03	4,35 ^{ef} ± 0,07	23,50 ^{bc} ± 0,38	41,58 ^h ± 0,29	6,36 ^h ± 0,13	6,90 ^h ± 0,26
10	1,35 ^b ± 0,05	98,2 ^b ± 0,01	1,76 ^h ± 0,05	4,93 ^j ± 0,03	4,19 ^{gh} ± 0,07	23,95 ^{cd} ± 0,68	43,32 ^d ± 0,24	7,68 ^c ± 0,15	9,30 ^d ± 0,13
11	1,10 ^d ± 0,01	97,6 ^{de} ± 0,01	2,07 ^e ± 0,02	6,41 ^a ± 0,02	4,94 ^a ± 0,18	27,65 ^f ± 0,75	46,53 ^a ± 0,46	7,85 ^b ± 0,06	11,01 ^b ± 0,11
12	1,93 ^a ± 0,03	98,0 ^{bcd} ± 0,00	1,88 ^g ± 0,04	5,03 ^{ghi} ± 0,03	4,28 ^{fg} ± 0,07	25,41 ^e ± 0,31	44,17 ^c ± 0,97	7,43 ^d ± 0,10	9,75 ^c ± 0,39
13	1,34 ^{bc} ± 0,01	98,7 ^a ± 0,01	1,30 ⁿ ± 0,02	5,07 ^{efg} ± 0,03	4,21 ^g ± 0,03	23,71 ^{bcd} ± 0,65	43,08 ^{de} ± 0,07	6,95 ^f ± 0,32	8,79 ^e ± 0,27
14	1,02 ^d ± 0,05	97,5 ^e ± 0,01	2,16 ^d ± 0,03	5,40 ^b ± 0,04	3,10 ⁱ ± 0,08	47,33 ⁱ ± 0,36	46,67 ^a ± 0,01	8,27 ^a ± 0,11	11,97 ^a ± 0,09
15	1,22 ^c ± 0,03	96,1 ^g ± 0,01	3,87 ^a ± 0,03	5,41 ^b ± 0,03	4,08 ^{eh} ± 0,04	26,01 ^e ± 0,86	46,72 ^a ± 0,05	8,38 ^a ± 0,03	12,01 ^a ± 0,10
16	1,30 ^{bc} ± 0,10	98,8 ^{ab} ± 0,01	1,60 ^{jk} ± 0,04	5,00 ^{hi} ± 0,02	4,48 ^d ± 0,07	24,89 ^{de} ± 0,59	41,21 ^{hi} ± 0,02	6,12 ⁱ ± 0,02	6,27 ⁱ ± 0,15
17	1,33 ^{bc} ± 0,02	98,0 ^{cde} ± 0,01	2,21 ^{cd} ± 0,04	5,05 ^{fgh} ± 0,02	4,41 ^e ± 0,03	22,51 ^{ab} ± 0,12	42,34 ^{fg} ± 0,23	6,70 ^g ± 0,02	7,77 ^g ± 0,15
18	1,32 ^{bc} ± 0,10	98,2 ^{bcd} ± 0,01	1,95 ^f ± 0,05	5,22 ^c ± 0,01	4,72 ^b ± 0,04	30,69 ^g ± 1,02	40,73 ⁱ ± 0,18	5,92 ^j ± 0,05	6,05 ⁱ ± 0,13
19	1,00 ^d ± 0,01	97,6 ^f ± 0,01	2,54 ^b ± 0,03	6,39 ^a ± 0,01	4,19 ^{gh} ± 0,05	36,91 ^h ± 0,66	45,15 ^b ± 0,88	7,50 ^d ± 0,10	9,79 ^c ± 0,21
20	1,22 ^c ± 0,08	98,5 ^{ab} ± 0,01	1,55 ^{kl} ± 0,05	4,99 ⁱ ± 0,01	4,35 ^{ef} ± 0,07	23,50 ^{bc} ± 0,38	42,58 ^{ef} ± 0,29	6,36 ^h ± 0,13	6,88 ^h ± 0,22

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ort±SD, n=3).

Tablo 3.5 Dibek kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri^a

Örn. no	Kafein (%)	Kuru madde (%)	Nem (%w/w)	pH	Kül (%)	SÇM (%)	Renk Parametreleri		
							<i>L</i>	<i>a</i> *	<i>b</i> *
1	0,32 ^e ± 0,01	97,06 ^d ± 0,01	2,93 ^c ± 0,01	6,48 ^d ± 0,03	3,85 ^c ± 0,05	72,02 ^f ± 0,60	51,82 ^f ± 0,02	6,27 ^d ± 0,02	9,61 ^h ± 0,03
2	0,81 ^a ± 0,01	97,56 ^b ± 0,01	2,44 ^e ± 0,01	5,55 ^f ± 0,02	3,11 ^d ± 0,01	57,95 ^h ± 0,10	49,52 ^g ± 0,02	6,94 ^b ± 0,02	10,79 ^g ± 0,01
3	0,38 ^d ± 0,02	97,04 ^e ± 0,01	2,96 ^b ± 0,01	6,40 ^e ± 0,03	3,87 ^c ± 0,02	71,01 ^g ± 0,16	63,44 ^c ± 0,05	6,55 ^c ± 0,03	13,26 ^b ± 0,02
4	0,14 ^f ± 0,01	97,19 ^c ± 0,01	2,83 ^d ± 0,01	7,04 ^a ± 0,01	2,59 ^f ± 0,02	94,50 ^a ± 0,06	63,92 ^b ± 0,07	5,61 ^f ± 0,02	11,69 ^f ± 0,01
5	0,37 ^d ± 0,01	97,17 ^c ± 0,01	2,84 ^d ± 0,01	6,78 ^c ± 0,01	3,88 ^c ± 0,03	75,08 ^e ± 0,11	61,14 ^d ± 0,01	5,81 ^e ± 0,02	11,89 ^e ± 0,02
6	0,47 ^b ± 0,02	97,83 ^a ± 0,01	2,16 ^f ± 0,01	7,03 ^a ± 0,01	3,98 ^b ± 0,06	78,79 ^d ± 0,48	53,81 ^e ± 0,19	7,70 ^a ± 0,06	13,85 ^a ± 0,02
7	0,36 ^d ± 0,01	97,04 ^e ± 0,01	2,96 ^b ± 0,01	6,92 ^b ± 0,02	2,88 ^e ± 0,02	87,97 ^b ± 0,17	65,74 ^a ± 0,10	5,65 ^f ± 0,03	12,90 ^c ± 0,02
8	0,41 ^c ± 0,02	96,23 ^f ± 0,01	3,75 ^a ± 0,01	6,81 ^c ± 0,01	4,09 ^a ± 0,03	82,03 ^c ± 0,32	65,75 ^a ± 0,02	5,63 ^f ± 0,05	12,86 ^d ± 0,01

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ort±SD, n=3).

Tablo 3.6 Menengiç kahvelerinde belirlenen kafein, kuru madde, nem, pH, kül, suda çözünen madde, renk değerleri^a

Örn. no	Kafein (%)	Kuru madde (%)	Nem (%w/w)	pH	Kül (%)	SÇM (%)	Renk Parametreleri		
							<i>L</i>	<i>a</i> *	<i>b</i> *
1	T.E.	98,41 ^{cd} ± 0,04	1,54 ^b ± 0,02	5,46 ^a ± 0,03	2,50 ^d ± 0,02	10,43 ^c ± 0,06	29,27 ^b ± 0,06	2,32 ^{bc} ± 0,03	1,96 ^d ± 0,01
2	T.E.	98,46 ^c ± 0,03	1,56 ^b ± 0,02	5,23 ^f ± 0,01	3,87 ^a ± 0,02	10,15 ^e ± 0,07	28,96 ^d ± 0,01	2,18 ^{de} ± 0,02	1,92 ^d ± 0,02
3	T.E.	98,43 ^c ± 0,05	1,65 ^a ± 0,03	5,24 ^{ef} ± 0,01	2,73 ^c ± 0,16	10,56 ^b ± 0,06	29,29 ^a ± 0,10	2,24 ^a ± 0,03	1,86 ^{ab} ± 0,06
4	T.E.	98,34 ^d ± 0,01	1,66 ^a ± 0,01	5,23 ^f ± 0,01	3,14 ^b ± 0,19	9,91 ^f ± 0,08	29,46 ^a ± 0,04	2,32 ^{ab} ± 0,05	1,93 ^a ± 0,03
5	T.E.	98,49 ^{bc} ± 0,08	1,48 ^c ± 0,02	5,29 ^{cd} ± 0,01	3,72 ^a ± 0,12	11,01 ^a ± 0,05	29,49 ^a ± 0,02	2,32 ^c ± 0,10	2,27 ^b ± 0,07

6	T.E.	99,45 ^a ± 0,03	0,84 ^e ± 0,02	5,37 ^b ± 0,02	2,65 ^{cd} ± 0,04	10,31 ^d ± 0,04	29,15 ^c ± 0,02	2,22 ^d ± 0,02	2,08 ^d ± 0,03
7	T.E.	98,56 ^b ± 0,05	1,17 ^d ± 0,04	5,27 ^{de} ± 0,02	3,05 ^b ± 0,04	10,44 ^c ± 0,06	28,99 ^c ± 0,02	2,14 ^e ± 0,01	1,94 ^d ± 0,04
8	T.E.	98,43 ^c ± 0,03	1,18 ^d ± 0,05	5,30 ^c ± 0,02	3,13 ^b ± 0,04	10,09 ^e ± 0,07	29,16 ^e ± 0,04	2,39 ^{ab} ± 0,01	2,17 ^c ± 0,06

^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir (Ort±SD, n=3).

3.3 Üretilen Kahvelere İlişkin Bulgular

3.3.1 Asparaginaz Enzimi Uygulaması

Bu çalışmada, Novozymes firmasının önerdiği enzim uygulama koşullarına uyulmaya özen gösterilmiştir. Yeşil kahve çekirdekleri 45 dakika 100°C'lik su buharına maruz bırakılmış ve 180 g yeşil kahve çekirdeği üzerine 40 mL enzim içeren su (0-4000 ASNU/kg yeşil kahve çekirdeği olacak şekilde) spreyleneştir. Vakum poşetinde vakum pompası yardımıyla vakumlanan çekirdekler, 60°C'lik su banyosunda 30-120 dakika arasında değişen sürelerde bekletilmiştir. Son olarak, etüvde 80°C'de 2 saat kurutulup akabinde ev tipi kavurucuda kavrulmuştur.

3.3.2 Kahve Kavurması Sırasında Akrilamid Oluşumunun Engellenmesi

Akrilamid azaltımı yapmak amacıyla asparaginaz enzimi uygulaması gerçekleştirebilmek için MKT'ye göre bağımsız değişkenler ve değer aralıkları girilerek çalışılacak deney koşulları tablosu elde edilmiştir (Tablo 2.2). Bu koşullarda deney yapılarak elde edilen bağımlı değişken olan akrilamid verileri µg/kg cinsinden tespit edilmiştir. Laboratuvar şartlarında kavrulan ve öğütülen kahvelerde akrilamid analizi yapılmıştır. Üretilen kahvelerin akrilamid seviyesinin 210,0±4,0 ile 331,0±2,0 µg/kg aralığında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7 Akrilamid Analizi Sonuçları

Deney no	Akrilamid (µg/kg)
1	290,0±2,0
2	227,0±3,0

3	300,0±3,0
4	331,0±2,0
5	232,0±4,0
6	227,0±2,0
7	285,0±5,0
8	217,0±3,0
9	210,0±4,0
10	250,0±4,0
11	225,0±3,0
12	220,0±5,0
13	229,0±3,0

Matematiksel optimizasyona göre farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde asparaginaz enzimi ile muamele edilen yeşil kahve çekirdeklerini laboratuvar koşullarında ev tipi kavurucuda 180°C’de kavurarak toplam 13 adet kahve üretilmiştir (Şekil 3.6).

Firmadan temin edilen yeşil kahve çekirdeği toz haline getirildikten sonra serbest asparajin amino asidi analizi yapılmıştır. Yeşil kahve çekirdeklerinin serbest asparajin miktarı 710,0±5,0 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde, yeşil kahvede akrilamid oluşumuna katkıda bulunan asparajin miktarının 200-1000 mg/kg aralığında değiştiği yapılan önceki çalışmalarda saptanmıştır (Guenther vd., 2007). Yine Murkovic ve Derler (2006), yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin konsantrasyonunun 280 ile 960 mg/kg aralığında değiştiğini saptamışlardır.

Kurutma aşamasından sonra öğütülen yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin konsantrasyonunun 566,3±7,8 ile 673,3±4,2 mg/kg aralığında olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.8). Bu değerleri belirleyebilmek için değişen konsantrasyonlarda asparajin standartları HPLC cihazında okutulmuştur (Şekil 3.7)

Ayrıca, üretilen kahve örneklerinin akrilamid konsantrasyonları ile yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin miktarları arasında, orta düzeyde pozitif ilişki ($r=0,669$,

$p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, Lantz vd. (2006) yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin konsantrasyonu ile bu çekirdeklerin kavrulmasıyla elde edilen kahvelerin akrilamid konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon saptamışlardır.



Deney 1



Deney 2



Deney 3



Deney 4



Deney 5



Deney 6



Deney 7



Deney 8



Deney 9



Deney 10



Deney 11



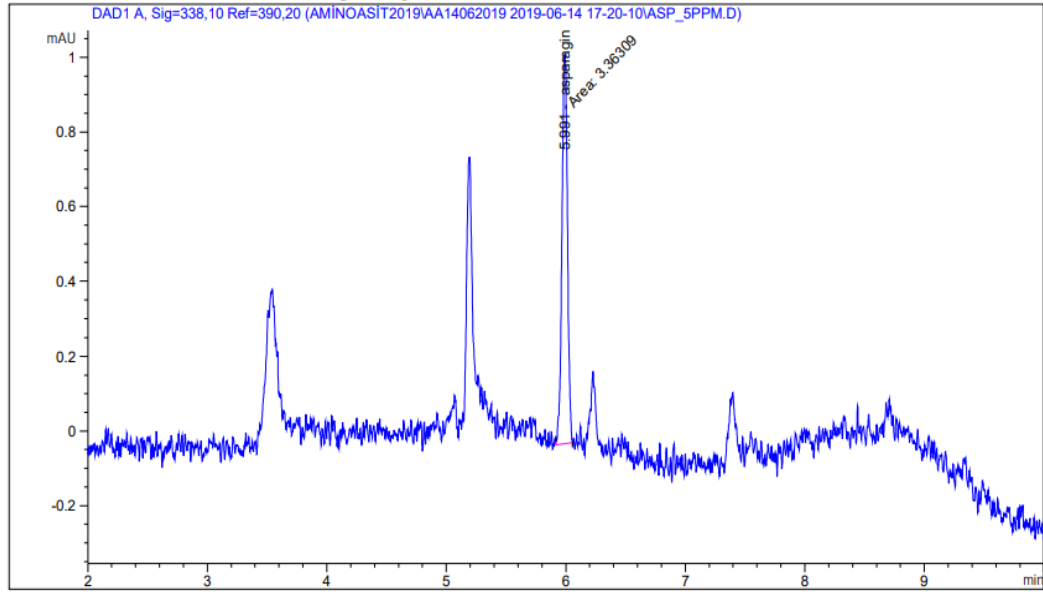
Deney 12



Şekil 3.6 Üretilen kahveler

Tablo 3.8 Kurutma aşamasından sonra yeşil kahve çekirdeklerinin asparajin konsantrasyonları

Deney no	Asparajin (mg/kg)
1	673,3±4,2
2	579,7±2,5
3	604,7±4,7
4	671,7±3,5
5	626,0±4,0
6	621,7±5,0
7	656,0±6,6
8	617,7±2,5
9	566,3±7,8
10	647,0±6,3
11	616,0±5,6
12	623,7±3,8
13	582,0±7,2



Şekil 3.7 Asparajin standardına (5 mg/kg) ait kromatogram

MKT kullanılarak belirlenen deneysel parametreler için elde edilen akrilamid cevapları Tablo 3.7’de verilmiştir. Oluşturulan modellerin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir (Tablo 3.9). Bu yöntemle her bir faktörün kuadratik etkilerinin yanıtlar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesinde Fischer (F-testi) testi uygulanarak belirlenmiştir. Önerilen modelin sistemin gerçek yanıtına uygun bir yaklaşım olup olmadığına, “lack of fit” den kaynaklanan hatanın önemsiz ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşuluyla karar verilmiştir. Ayrıca, modelin uygunluğu regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj- R^2) kullanılarak test edilmiştir.

Tablo 3.9 Akrilamid Yanıtı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı (sum of squares)	Serbestlik derecesi (DF)	Ortalamanın karesi (mean square)	F değeri	p değeri Prop>F	
Model	16230.93	5	3246.19	13.46	0.0018	Önemli
A-Doz	7350.00	1	7350.00	30.47	0.0009	
B-Süre	1350.00	1	1350.00	5.60	0.00499	

AB	1122.25	1	1122.25	4.65	0.0679	
A ²	2440.21	1	2440.21	10.12	0.0155	
B ²	1554.50		1554.50	6.45	0.0387	
Arta Kalan (Residual)	1688.30	7	241.19			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	1393.50	3	464.50	6.30	0.0537	Önemli değil
Hata (Pure Error)	294.80	4	73.70			
Düzeltilmiş Toplam	17919.23	12				

Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde p değerinin 0,05'in altında olması gerekmektedir. Elde edilen 0,0018 değeri ve yüksek F-değeri (13,46) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir (Tablo 3.9). Bağımsız değişken olan konsantrasyon ve muamele süresine ait p değerlerinin 0,05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde akrilamid oluşumunu etkilediğini göstermektedir. Parametreler içinde en yüksek p değerine sahip olan muamele süresi akrilamid oluşumunda en az etkiye sahiptir. Ayrıca, modelin başarılı olması için uyum eksikliğinin anlamlı olmaması ($p > 0,05$) gerekmektedir. 0,0537 olan uyum eksikliği değeri, öngörülen eşitliğin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda akrilamid konsantrasyonunu önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

0,9058 olan R^2 değeri toplam değişimin %90,58'inin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca %9,42'unun modelle ifade edilemeyeceğini göstermektedir. Tablo 3.10'da belirtildiği üzere R^2 ve Adj- R^2 değerlerinin 1'e ve birbirine yakın olması modelin başarısının bir göstergesidir (Erşan ve Açikel, 2014; Sağcan, 2016). %C.V. (coefficient of variation) değeri 6,23'dür.

DeneySEL tasarımlara uygun olarak yapılan deneylerde elde edilen akrilamid değerleri regresyon analizine tabi tutularak aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.

Akrilamid için elde edilen eşitlikteki pozitif ve negatif işaretler sırasıyla sinerjik ve antagonistik etkileri göstermektedir (Garba vd., 2014).

$$\text{Akrilamid (ppb) (Y1)} = +224.79 - 35.00*A - 15.00*B + 16.75*A*B + 29.72*A^2 + 23.72*B^2 \text{ (coded factors)} \quad (3.1)$$

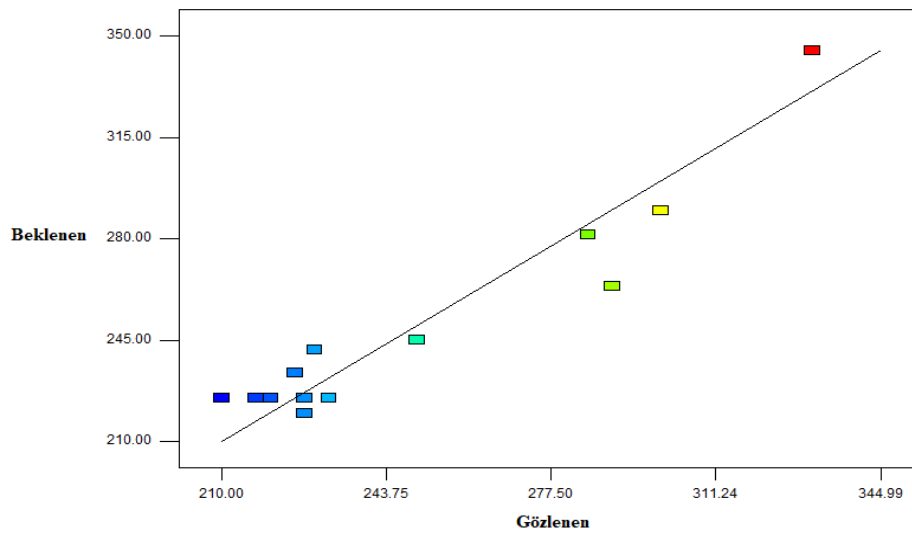
Y1, akrilamid oluşumu için tahmin edilen yanıttır (predicted response). A ve B kodları sırasıyla enzim dozu ve süre yerine kullanılmıştır. Akrilamid için elde edilen Denklem 3.1 incelendiğinde A ve B katsayısının negatif değer alması doz ve sürenin artırılmasıyla akrilamid oluşumunun azaldığını göstermektedir.

Gerçeklik (authenticity), 11,893 olan adeq-precision (ses/gürültü) değerine bakılarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.10). Bu değer 4'ün üstünde olması model için uygundur.

Tablo 3.10 Kuadratik model için istatistiksel verilerin özeti

Response	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Adeq-Pre	Std.Dev	Mean	%C.V.
Akrilamid	0.9058	0.8385	0.2721	11.893	15.53	249.46	6.23

Şekil 3.8'da beklenen ve gözlenen değerler arasındaki ilişki verilmiştir. Görüldüğü üzere beklenen ve gözlenen akrilamid değerleri arasında çok fazla farklılık gözlenmemektedir. Akrilamid oluşumuna deneysel parametrelerin etkisi yüzey yanıt grafiği çizilerek gösterilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8 Akrilamid için beklenen ve gözlenen değer arasındaki ilişki

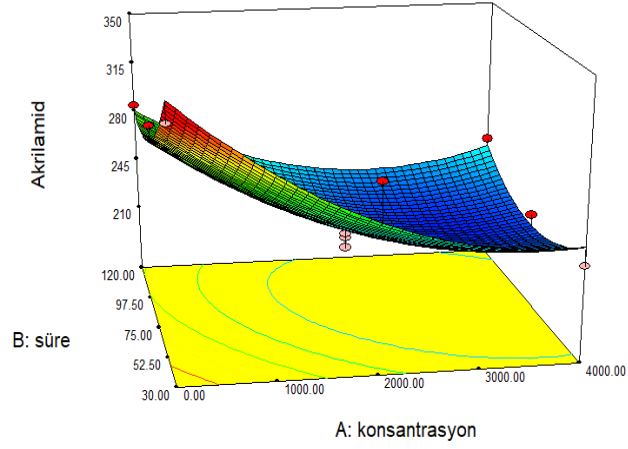
Akrilamid

331

210

X1 = A: konsantrasyon

X2 = B: süre



Şekil 3.9 Akrilamide ait yüzey grafiği (3D görünümü)

Akrilamid oluşumu açısından optimum nokta; 3110,2 ASNU ve 80,4 dakika olarak bulunmuştur. Bu noktada elde edilen minimum akrilamid konsantrasyonu 214 $\mu\text{g/kg}$ 'dır (istenebilirlik değeri (desirability value): 0,965).

3.3.3 Üretilen Kahvelerin Renk Değerleri

Kavrulan kahvelerde renk analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklere ait L^* , a^* ve b^* değerleri Tablo 3.11'de verilmektedir. Kahvelerin L^* değerinin 40,89-41,98 arasında değiştiği yani kahvelerin orta kavrulmuş olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.11 Üretilen kahvelerin renk değerleri

Deney no	L^*	a^*	b^*
1	41,98 $\pm$ 0,01	7,75 $\pm$ 0,02	9,82 $\pm$ 0,03
2	41,69 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,01	9,72 $\pm$ 0,02
3	41,64 $\pm$ 0,01	7,70 $\pm$ 0,02	9,68 $\pm$ 0,02
4	41,02 $\pm$ 0,03	7,62 $\pm$ 0,04	9,61 $\pm$ 0,03
5	41,55 $\pm$ 0,04	7,80 $\pm$ 0,03	9,59 $\pm$ 0,01
6	41,61 $\pm$ 0,05	7,62 $\pm$ 0,06	9,30 $\pm$ 0,06
7	40,99 $\pm$ 0,04	7,49 $\pm$ 0,05	9,10 $\pm$ 0,05

8	41,95±0,02	7,70±0,03	9,75±0,01
9	40,95±0,01	7,30±0,05	9,05±0,02
10	40,89±0,03	7,15±0,04	9,01±0,04
11	41,45±0,01	7,56±0,03	9,17±0,02
12	41,96±0,02	7,95±0,03	9,89±0,01
13	41,74±0,04	7,82±0,03	9,31±0,02

3.3.4 Üretim Aşamasında Kahve Örneklerinin Nem Oranları

Firmadan temin edilen yeşil kahve çekirdeklerinin nem değerinin %9,08 olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Caporaso vd. (2018) mikrobiyel gelişmeyi önlemek ve duyu kaliteyi korumak için %8,0-12,5 aralığında nem içeriğinin yeşil kahve çekirdekleri için kabul edilebilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sulu enzim solüsyonu ile muamele edilen ve etüvde kurutulan yeşil kahve çekirdeklerinin nem miktarının %7,40-8,29 arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.12). Bu değerler, enzim uygulamasından sonra yeşil kahve çekirdekleri nem içeriği %7-12 aralığında olacak biçimde kurutulmalı önerisiyle uygunluk göstermektedir (Lynglev ve Schoesler, 2016).

Tablo 3.12 Kahve Örneklerinin Nem Oranları

Deney no	Nem (%)
1	7,67
2	7,40
3	7,93
4	7,80
5	7,94
6	7,93
7	8,07
8	8,29

9	8,18
10	8,21
11	8,15
12	8,26
13	8,28

3.3.5 Üretim Aşamasında Kahve Örneklerinin Şeker Oranları

Firmadan temin edilen yeşil kahve çekirdeklerinin glikoz, fruktoz ve sükroz konsantrasyonlarının sırasıyla %0,22, %0,37 ve %7,00 olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Clarke ve Vitzthum (2008) yeşil arabika türü kahve çekirdeklerinin %6,25-8,45 aralığında değişen bir sükroz içeriğine sahip olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar, Knopp vd. (2006) tarafından bulunan glikoz (%0,23), fruktoz (%0,39) ve sükroz (%7,07) verileriyle de paralellik göstermektedir.

Enzim içeren su ile muamele edilen ve etüvde kurutulan yeşil kahve çekirdeklerine ait şeker konsantrasyonları Tablo 3.13’de verilmiştir. Bu değerlerden anlaşılabacağı üzere; enzim uygulaması işlemi yeşil kahve çekirdeklerinin indirgen şeker ve sükroz konsantrasyonunda bir miktar azalmaya neden olmuştur.

Tablo 3.13 Kurutma aşamasından sonra yeşil kahve çekirdeklerinin glikoz, fruktoz ve sükroz seviyeleri

Deney no	Glikoz (%)	Fruktoz (%)	Sükroz (%)
1	T.E.	0,10±0,02	6,17±0,03
2	0,04±0,01	0,10±0,01	6,70±0,05
3	0,04±0,01	0,11±0,01	6,64±0,02
4	0,09±0,01	0,12±0,01	6,69±0,04
5	0,09±0,01	0,22±0,02	6,78±0,05
6	T.E.	0,11±0,01	6,39±0,03
7	0,04±0,01	0,25±0,01	6,71±0,03
8	T.E.	0,11±0,01	5,84±0,05
9	T.E.	0,20±0,01	6,91±0,05

10	T.E.	0,21±0,01	6,92±0,04
11	T.E.	0,25±0,01	6,52±0,04
12	T.E.	0,10±0,01	5,94±0,02
13	T.E.	0,11±0,01	6,53±0,02

3.3.6 Üretilen Kahvelerin Uçucu Bileşen Profili

Optimum koşullarda enzim uygulanarak ve enzim uygulanmadan üretilen Türk kahvesinde belirlenen aroma maddeleri (uçucu bileşenler) Tablo 3.14’te verilmiştir. Aroma maddelerinin tanımlanmasında kütle spektroskopisinin kütüphanesi (MS), aroma maddeleri standartları (Std) ve linear alıkonma indisi (LRI) değerlerinden faydalanılmıştır. Bu bileşiklerin gaz kromatografisinden elde edilen kromatogramları ise Şekil 3.10’da verilmiştir.

Üretilen kahvelerde toplam 61 adet aroma maddesi tespit edilmiştir. Aromaların çeşitli kimyasal molekül gruplarından (furanlar, esterler, pirazinler, piridinler, laktonlar, fenoller, asitler, aldehytler, alkoller, piroller, terpenler ve diğer bileşikler) oluştuğu görülmüştür. Aroma maddelerinin toplam miktarının belirlenen optimum koşullara göre enzim uygulanan kahvede 73386 µg/kg, enzim uygulanmadan üretilen Türk kahvesinde ise 75960 µg/kg olduğu saptanmıştır. Enzim uygulama işlemi, Türk kahvesinde tespit edilen toplam aroma miktarını %3,4 düşürmüştür. Benzer şekilde, Xu (2018) yaptığı doktora çalışmasında kavru lan kahvenin %10’luk uçucu aroma bileşeninin (aldehit, keton, furan, fenol ve pirazin gruplarını içeren) asparaginaz enzimi uygulamasından önemli bir şekilde etkilendiğini tespit etmiştir.

Üretilen kahvelerde toplam 61 adet aroma maddesi tespit edilmiştir. Optimum koşullarda enzim uygulanarak üretilen Türk kahvesinde tespit edilen aroma maddelerinin %30,46’sını pirazinler, %28,59’unu furanlar, %7,55’ini fenoller, %6,88’ini esterler, %4,38’ünü piroller, %4,12’sini aldehitler, %3,27’sini asitler, %3,27’sini alkoller, %2,52’sini terpenler ve terpenoitler, %2,09’unu piridinler, %0,48’ini laktonlar ve %6,89’unu diğer bileşiklerin oluşturduğu saptanmıştır. Enzim uygulanmadan üretilen Türk kahvesinde ise toplam aroma maddelerinin

%29,94'ünü pirazinler, %27,22'sini furanlar, %7,57'sini fenoller, %6,65'ini esterler, %4,96'sını aldehitler, %4,36'sını piroller, %3,20'sini alkoller, %3,12'sini terpenler ve terpenoitler, %2,93'ünü asitler, %2,64'ünü piridinler, %0,71'ini laktonlar ve %6,69'unu diğer bileşiklerin oluşturduğu belirlenmiştir.

Nitrojen içeren heterosiklik bileşik sınıfları olan pirazinler, piridinler ve piroller kahvenin kendine has aromasının oluşmasında önemli bir yere sahiptirler (Ayseli, 2015). Kavurma sırasında, yeşil kahvede doğal olarak bulunan indirgen şekerlerin ve proteinlerin arasında oluşan Maillard reaksiyonu pirazinler, piridinler ve piroller dahil olmak üzere birçok heterosiklik bileşiğin oluşmasından sorumludur (Lopez-Galilea vd., 2006). Enzim uygulanan kahvede 14 pirazin (Pirazin, 2-Metilpirazin, 2,5-Dimetilpirazin, 2,6-Dimetilpirazin, 2-Etilpirazin, 2,3-Dimetilpirazin, 2-Etil-5-metilpirazin, 2,3,5-Trimetilpirazin, 2-Etil-3-metilpirazin, 2,6-Dietilpirazin, 2,3-Dietilpirazin, 2-Metoksi-3-(2-metilpropil)pirazin, 2-Asetil-3-metilpirazin ve 2-(2-furil)-pirazin), 2 piridin (Piridin, Triazol piridin) ve 2 pirol (2-Asetil pirol, 2-Formil-4,5-dimetil pirol) saptanmıştır (Tablo 3.14). Bu bileşiklerin birçoğu Türk kahvesinde yapılan diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir (Ayseli, 2015; Amanpour ve Selli, 2016). Pirazinler içinde miktar olarak en fazla 2,5-Dimetilpirazin ve 2-Metilpirazin tespit edilmiş, bunu 2-Asetil-3-metilpirazin ve 2-Etil-5-metilpirazin izlemiştir. Önceki çalışmalarda, 2-Metilpirazin bileşiğinin kahveye fındıksı ve kavrulmuş kokular verdiği belirlenmiştir (Hashim ve Chaveron, 1995). Enzim uygulamasıyla pirazin, piridin ve pirol bileşiklerinin toplam miktarının azaldığı görülmüştür.

Kahvenin önemli bileşen gruplarından biri de furanlardır. Uçuculuğu yüksek olan furan bileşikleri kahveye verdiği meyvemsi, kavrulmuş, yanık, acımsı ve tatlı kokular nedeniyle önemli bir aroma grubudur. Furanlar, kahvede bulunan çeşitli maddelerin (heksoz ve pentoz gibi polisakkaritler, lipit, terpen, protein, tiyamin, nükleotit) parçalanması ve Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır (Ludwing vd., 2014). Kahvelerde 8 adet furan bileşiği belirlenmiş olup, 5-Metil furfural, 2-Asetilfuran, Furfural, 2,2-Bis furan ve 5-Hidroksimetil furfural (HMF) en yüksek konsantrasyonda tespit edilen furan bileşikleridir. Benzer sonuçlar, Arabica çeşidi

kahvelerde Petisca vd. (2013), Moon ve Shibamoto (2009) ve Budryn vd. (2011) tarafından da elde edilmiştir.

Uçucu fenoller kahve aromasının karakteristik aromasının oluşumunda etkili bileşiklerdir. Bu çalışmada, *p*-vinil guaiakol, fenol, vanilin ve orto-guaiakol en yüksek konsantrasyonda tespit edilen fenol bileşikleridir. Benzer şekilde, Tressl (1989) kahvede oluşan guaiakol ve vanillin gibi bileşiklerin öncül bileşikler olduğunu saptamışlardır.

Tablo 3.14 Enzim Uygulanarak ve Enzim Uygulanmadan Üretilen Kahvelerde Belirlenen Uçucu Aroma Bileşikleri

No	LRI*	Bileşiğin Adı	Konsantrasyon ($\mu\text{g/kg}$) ⁺		Tanımlama [#]
			Enzim uygulanmayan	Enzim uygulanan	
		Furanlar			
1	<1170	3-Metil furan	141	120	LRI, MS, tent
2	1230	2-Pentil furan	562	1310	LRI, MS, tent
3	1462	Furfural	1560	7080	LRI, MS, tent
4	1571	5-Metil furfural	10263	7822	LRI, MS, Std
5	1592	2,2-Bis furan	962	598	LRI, MS, tent
6	1774	2-Asetilfuran	6073	3279	LRI, MS, tent
7	1942	2,3-Dimetil benzofuran	309	249	LRI, MS, tent
8	2512	5-Hidroksimetil furfural (HMF)	812	573	LRI, MS, Std
		Toplam	20682	21031	
		Pirazinler			
9	1207	Pirazin	728	410	LRI, MS, Std
10	1258	2-Metilpirazin	4261	3584	LRI, MS, Std
11	1311	2,5-Dimetilpirazin	4536	3934	LRI, MS, Std
12	1319	2,6-Dimetilpirazin	1115	1691	LRI, MS, Std

13	1328	2-Etilpirazin	842	2045	LRI, MS, tent
14	1334	2,3-Dimetilpirazin	1444	805	LRI, MS, Std
15	1380	2-Etil-5-metilpirazin	1909	1571	LRI, MS, tent
16	1391	2,3,5-Trimetilpirazin	755	112	LRI, MS, tent
17	1394	2-Etil-3-metilpirazin	1262	3154	LRI, MS, tent
18	1423	2,6-Dietilpirazin	846	771	LRI, MS, tent
19	1445	2,3-Dietilpirazin	210	305	LRI, MS, tent
20	1519	2-Metoksi-3-(2-metilpropil)pirazin	1317	1124	LRI, MS, tent
21	1679	2-Asetil-3-metilpirazin	2990	1788	LRI, MS, tent
22	1975	2-(2-furil)-pirazin	528	1112	LRI, MS, tent
		Toplam	22743	22406	
		Piridinler			
23	1171	Piridin	1166	750	LRI, MS, Std
24	1584	Triazol piridin	837	790	LRI, MS, tent
		Toplam	2003	1540	
		Laktonlar			
25	2059	Hekzalakton, gama	537	354	LRI, MS, tent
		Toplam	537	354	
		Fenoller			
26	1663	Vanilin	849	917	LRI, MS, Std
27	1860	Orto-guaiakol	994	1077	LRI, MS, tent
28	1878	Guaiakol (2-Methoksi fenol)	518	447	LRI, MS, Std
29	2018	Fenol	1213	1296	LRI, MS, Std
30	2196	<i>p</i> -vinil guaiakol	2177	1821	LRI, MS, Std

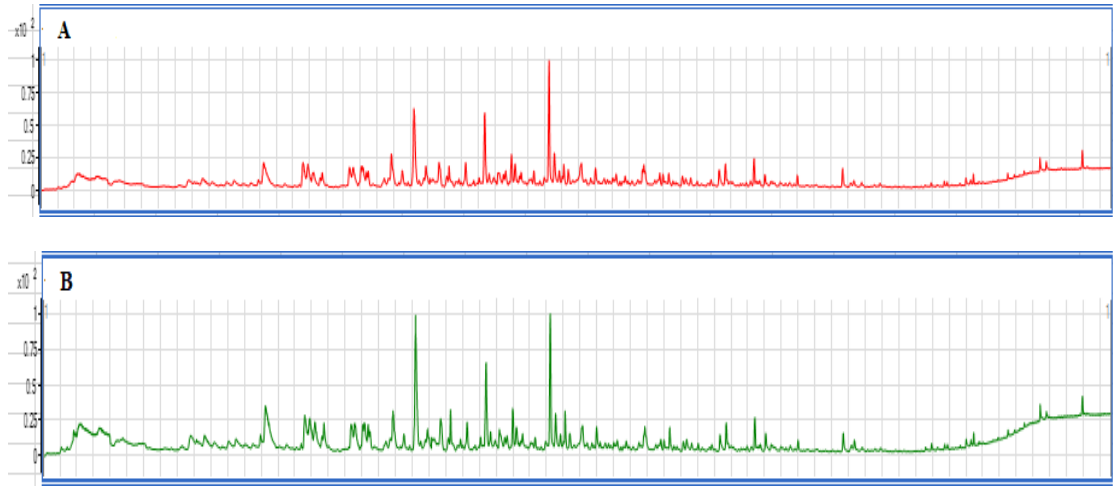
		Toplam	5751	5558	
		Asitler			
31	1474	Piruvik asit	685	517	LRI, MS, tent
32	1491	Asetik asit	620	1130	LRI, MS, Std
33	1702	İzovalerik asit	918	760	LRI, MS, tent
		Toplam	2223	2407	
		Aldehit			
34	1513	Benzaldehit	1382	1048	LRI, MS, tent
35	1624	<i>p</i> -Tolualdehit	1099	925	LRI, MS, tent
36	1817	2,3,6-Trimetil benzaldehit	707	603	LRI, MS, tent
37	2010	<i>p</i> -Anisaldehit	427	306	LRI, MS, tent
38	2406	<i>m</i> -Tolualdehit	156	151	LRI, MS, tent
		Toplam	3771	3033	
		Alkoller			
39	1199	2-Hekzanol	380	365	LRI, MS, Std
40	1599	3-Metil katekol	1196	946	LRI, MS, tent
41	1909	Feniletil alkol	856	708	LRI, MS, tent
		Toplam	2432	2019	
		Piroller			
42	1391	2-Formil-4,5-dimetil pirol	1816	1945	LRI, MS, tent
43	1973	2-Asetil pirol	1499	1280	LRI, MS, tent
		Toplam	3315	3225	
		Terpenler ve terpenoitler			
44	<1170	<i>p</i> -simen	1527	946	LRI, MS, tent
45	1527	Foeniculin	422	497	LRI, MS, tent
46	1554	Linalol	418	409	LRI, MS, tent
		Toplam	2367	1852	

		Esterler			
47	1542	Furfuril asetat	1630	1862	LRI, MS, tent
48	1601	Furfuril propanoat	413	352	LRI, MS, tent
49	1629	Hidrosinnamil asetat	187	311	LRI, MS, tent
50	1639	2-Fenil etil asetat	824	703	LRI, MS, tent
51	1701	Metil heksanoat	914	781	LRI, MS, tent
52	1760	Metil salisilat	772	693	LRI, MS, tent
53	1999	Metil 2-furoat	315	365	LRI, MS, tent
		Toplam	5055	5067	
		Diğer bileşikler			
54	1251	1-Nitro-2-feniletan	517	441	LRI, MS, tent
55	1640	2-Asetil tiyazol	596	582	LRI, MS, tent
56	1727	3-Metil-2-siklopenten-1-on	426	364	LRI, MS, tent
57	1730	4-Hidroksi cryptone	671	654	LRI, MS, tent
58	1766	2-Asetil tiyofen	729	623	LRI, MS, tent
59	1827	3-Metoksi-benzen asetonitril	1008	914	LRI, MS, tent
60	1961	Maltol	734	943	LRI, MS, Std
61	2441	İndol	400	545	LRI, MS, Std
		Toplam	5081	5066	
		Genel Toplam	75960	73558	

*LRI: Linear alıkonma indeksi ZB-WAXms kapilar kolon üzerinde hesaplanmıştır.

*Konsantrasyon: µg/kg olarak 3 farklı injeksiyon sonuçları ortalamasıdır.

#Tanımlama: LRI, Linear alıkonma indeksi, MS tent; geçici olarak MS ile tanımlanan, Std; Standart Kimyasal.



Şekil 3.10 (A) Enzim uygulanarak üretilen kahveye ait aroma profili (B) Enzim uygulanmadan üretilen kahveye ait aroma profili

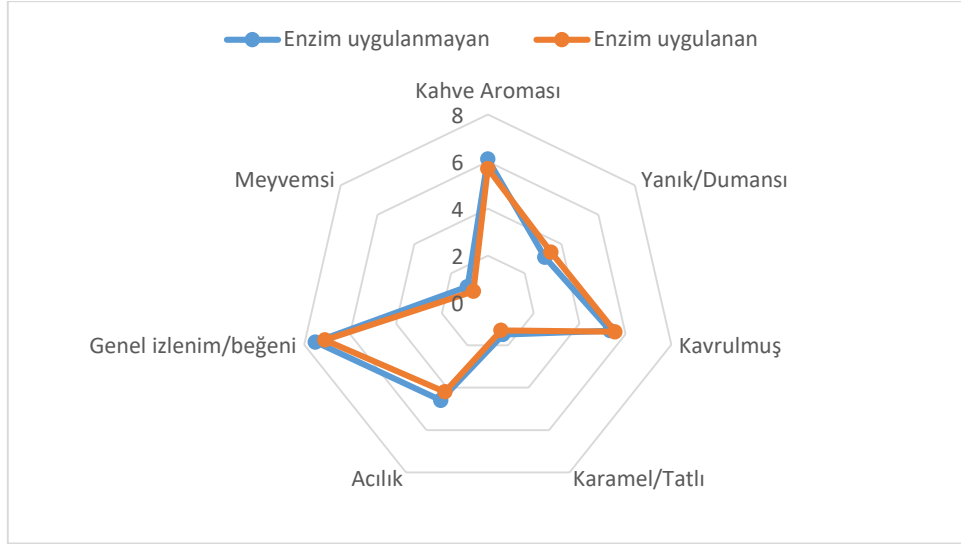
3.3.7 Üretilen Türk Kahvelerinin Duyusal Özellikleri

Panelistler belirlenen optimum koşullarda (3110,2 ASNU; 80,4 dakika) enzim uygulanan ve enzim uygulanmadan standart koşullarda üretilen Türk kahvelerini, 7 farklı parametreye göre değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonuçları Tablo 3.15'te verilmiş ve bu sonuçlar görsel olarak daha iyi yansıtılması için örümcek ağı diyagramı üzerinde Şekil 3.11'da gösterilmiştir. İki grubun ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını test etmek için T-testi kullanılmıştır.

Tablo 3.15 Pişirilen kahve örneklerinin lezzet profili analizi sonuçları

Duyusal özellikler	Enzim uygulanarak üretilen kahve	Enzim uygulanmadan üretilen kahve	F
Kahve aroması	5,70±0,16	6,10±0,10	ö.d.
Yanık/Dumansı	3,44±0,15	3,10±0,09	ö.d.
Kavrulmuş	5,55±0,09	5,35±0,15	ö.d.
Meyvemsi	0,78±0,12	1,10±0,11	ö.d.
Acılık	4,60±0,16	4,20±0,29	ö.d.
Karamel/Tatlı	1,30±0,08	1,50±0,11	ö.d.
Genel izlenim/Beğeni	7,10±0,11	7,51±0,17	ö.d.

*: ortalama değerler: $p < 0.05$ önem düzeyinde önemlidir, ö.d: önemli değil



Şekil 3.11 Kahve örneklerinin lezzet profil analiz sonuçlarının örümcek ağı diyagramı

İncelenen özellikler her iki kahve örneğinde yakın puanlar almıştır. Enzim uygulanmadan üretilen kahve aroma ve genel izlenim/beğeni açısından enzim uygulanan kahveye göre daha yüksek puanlar almışsa da bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

3.3.8 Kahvedeki Bazı Uçucu Pirazin Bileşenleri ve Akrilamid Konsantrasyonu Baz Alarak Yapılan Optimizasyonlar

Kavurma şartlarının kahvenin aroma profiline olan etkisiyle ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Schenker vd., 2002; Baggenstoss vd. 2008; Moon ve Shibamoto, 2009; Ayseli, 2015). Öte yandan, kahvenin aroma bileşiklerini ve akrilamid konsantrasyonunu baz alarak yapılmış kavurma şartları optimizasyonu çalışması oldukça sınırlıdır.

Madihah vd. (2012) pirazin konsantrasyonu (2-metilpirazin, 2,3-dimetilpirazin, 2,5-dimetilpirazin ve 2,3,5-trimetilpirazin) yüksek, akrilamid konsantrasyonu düşük kahve eldesi için MKT kullanarak kavurma koşullarını optimize etmişlerdir. 180°C'de 26 dakika kavrulan kahve çekirdeklerinin yüksek seviyede pirazin grubu aroma bileşiklerini ve düşük seviyede akrilamid (0,23 mg/100g) içerdiğini saptamışlardır.

Farah ve Zaibunnisa (2012), kakao çekirdeklerinde MKT kullanarak düşük seviyede akrilamid ve yüksek konsantrasyonda pirazin grubu (2-metilpirazin, 2,5-dimetilpirazin, 2,3,5-trimetilpirazin ve 2,3,5,6-tetra-pirazin) eldesi koşullarını belirlemeye çalışmışlardır. Yüksek kalitede kakao çekirdekleri elde etmek için optimum kavurma koşulunun 116°C ve 23 dakika olduğunu belirlemişlerdir.

Kahvedeki uçucu aroma bileşikleri kavurma aşamasında meydana gelen farklı reaksiyonlar (Maillard reaksiyonu, Strecker degradasyonu, şeker ve amino asitlerin degradasyonu) sonucunda oluşmaktadır. Ancak, akrilamid gibi istenmeyen bileşiklerin oluşumu da bu reaksiyonlara bağlıdır (Madiah vd., 2012). Dolayısıyla, bu çalışmada olduğu gibi asparaginaz enzimi kullanarak kahvede akrilamid azaltımı yapılmaya çalışılırken aroma bileşiklerinin oluşumunu da göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Pirazin, furan ve pirol grubu kahvenin önemli uçucu bileşen gruplarından (Kıvançlı ve Elmacı, 2014).

Bu tez çalışmasında, MKT’da önerilen koşullara göre üretilen 13 kahve örneğinin bağımlı değişkenlerine ait elde edilen veriler Tablo 3.16’da sunulmuştur.

Tablo 3.16 Bağımlı değişkenlere ait merkezi karma tasarım sonucu elde edilen veriler

Deney no	2-Metilpirazin	2,3-Dimetilpirazin	2,5-Dimetilpirazin	2-Asetil-3-Metilpirazin	Akrilamid
1	4261	1444	4536	2990	290
2	13395	1826	7064	4610	227
3	22547	1081	8497	3949	300
4	4584	805	3934	1788	331
5	14349	2205	7513	4562	232
6	19315	2232	5454	3323	227
7	23470	1006	6813	2696	285
8	17770	2490	7658	4052	217

9	13035	2684	6586	4248	210
10	11309	1206	5036	2440	250
11	21770	2007	4484	3023	225
12	20528	2503	8851	4141	220
13	9731	1110	4529	4068	229

2-Metilpirazin için elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.17’de gösterilmiştir. Modelin 0,0116 olan p değeri 0,05’in altındadır ve bu değer modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Bağımsız değişken olan muamele süresinin p değerinin 0,05’in altında olması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde akrilamid oluşumunu etkilediğini göstermektedir. 0,3847 olan uyum eksikliği değeri, öngörülen eşitliğin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda 2-Metilpirazin değeri önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

0,8349 olan R^2 değeri toplam değişimin %83,49’unun bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca %16,51’unun modelle ifade edilemeyeceğini göstermektedir. Tablo 3.18’de gösterildiği üzere R^2 (0,8349) ve Adj- R^2 (0,7170) değerlerinin 1’e ve birbirine yakın olması modelin başarısının bir göstergesidir.

Deneyssel tasarımlara uygun olarak yapılan deneylerde elde edilen 2-Metilpirazin değerleri regresyon analizine tabi tutularak Denklem 3.2 elde edilmiştir.

$$\text{2-Metilpirazin } (\mu\text{g/kg}) (Y_2) = +16623.34 - 1707.67 \cdot A + 6328.83 \cdot B - 4327.00 \cdot A \cdot B + 2287.79 \cdot A^2 - 5627.71 \cdot B^2 \quad (3.2)$$

Y_2 , 2-Metilpirazin oluşumu için tahmin edilen yanıttır (predicted response). A ve B kodları sırasıyla enzim dozu ve süre yerine kullanılmıştır. Gerçeklik (authenticity), 9,104 olan adeq-precision değerine bakılarak değerlendirilmiştir. Bu değer 4’ün üstünde olması model için uygundur.

2-Metilpirazin için elde edilen eşitlik incelendiğinde A katsayısının negatif ve B katsayısının pozitif değer alması enzim dozunun artırılmasıyla 2-Metilpirazin oluşumunun azaldığını uygulama süresinin artırılmasıyla 2-Metilpirazin oluşumunun arttığını göstermektedir.

Tablo 3.17 2-Metilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı (sum of squares)	Serbestlik derecesi (DF)	Ortalamanın karesi (mean square)	F değeri	<i>p</i> değeri Prop>F	
Model	4.203E+008	5	8.405E+007	7.08	0.0116	Önemli
A-Doz	1.750E+007	1	1.750E+007	1.47	0.2641	
B-Süre	2.403E+008	1	2.403E+008	20.24	0.0028	
AB	7.489E+007	1	7.489E+007	6.31	0.0403	
A ²	1.446E+007	1	1.446E+007	1.22	0.3063	
B ²	8.747E+007	1	8.747E+007	7.37	0.0300	
Arta Kalan (Residual)	8.311E+007	7	1.187E+007			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	4.134E+007	3	1.378E+007	1.32	0.3847	Önemli değil
Hata (Pure Error)	4.177E+007	4	1.044E+007			
Düzeltilmiş Toplam	5.034E+008	12				

Tablo 3.18 2-Metilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri

Response	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Adeq-Pre	Std.Dev	Mean	%C.V.
2-Metilpirazin	0.8349	0.7170	0.2009	9.104	3445.66	15081.85	22.85

2,3-Dimetilpirazin için elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.19’de gösterilmektedir. Modelin *p* değeri (0,0083) 0,05’in altındadır ve bu değer

modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. 0,4943 olan uyum eksikliği değeri, öngörülen eşitliğin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda 2-Metilpirazin değeri önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

0,8504 olan R^2 değeri toplam değişimin %85,04'ünün bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca %14,96'unun modelle ifade edilemeyeceğini göstermektedir. Tablo 3.20'de gösterildiği üzere R^2 (0,8504) ve Adj- R^2 (0,7436) değerlerinin 1'e ve birbirine yakın olması modelin başarısının bir göstergesidir.

Deneyssel tasarımlara uygun olarak yapılan deneylerde elde edilen 2,3-Dimetilpirazin değerleri regresyon analizine tabi tutularak Denklem 3.3 elde edilmiştir.

$$\text{2,3-Dimetilpirazin } (\mu\text{g/kg}) \text{ (Y3)} = +2342.79 + 276.00 \cdot A + 143.33 \cdot B - 26.25 \cdot A \cdot B - 689.28 \cdot A^2 - 620.28 \cdot B^2 \quad (3.3)$$

Y3, 2,3-Dimetilpirazin oluşumu için tahmin edilen yanıttır (predicted response). A ve B kodları sırasıyla enzim dozu ve süre yerine kullanılmıştır. Gerçeklik (authenticity), 7,758 olan adeq-precision değerine bakılarak değerlendirilmiştir. Bu değer 4'ün üstünde olması model için uygundur.

2,3-Dimetilpirazin için elde edilen eşitlik incelendiğinde A ve B katsayısının pozitif değer alması enzim dozu ve uygulama süresinin artırılmasıyla 2,3-Dimetilpirazin oluşumunun arttığını göstermektedir.

Tablo 3.19 2,3-Dimetilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı (sum of squares)	Serbestlik derecesi (DF)	Ortalamanın karesi (mean square)	F değeri	p değeri Prop>F	
Model	4.413E+006	5	8.827E+005	7.96	0.0083	Önemli
A-Doz	4.571E+005	1	4.571E+007	4.12	0.0819	
B-Süre	1.233E+005	1	1.233E+005	1.11	0.3268	
AB	2756.25	1	2756.25	0.025	0.0403	

A ²	1.312E+006	1	1.312E+006	11.83	0.0108	
B ²	1.063E+006	1	1.063E+006	9.58	0.0174	
Arta Kalan (Residual)	7.762E+005	7	1.109E+005			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	3.264E+005	3	1.088E+005	0.97	0.4903	Önemli değil
Hata (Pure Error)	4.498E+005	4	1.125E+005			
Düzeltilmiş Toplam	5.190E+006	12				

Tablo 3.20 2,3-Dimetilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri

Response	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Adeq-Pre	Std.Dev	Mean	%C.V.
2,3- Dimetilpirazin	0.8504	0.7436	0.2331	7.758	333.00	1738.38	19.16

2,5-Dimetilpirazin için elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.21’de gösterilmektedir. Modelin p değeri (0,0234) 0,05’in altındadır ve bu değer modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. 0,2851 olan uyum eksikliği değeri, öngörülen eşitliğin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda 2,5-Dimetilpirazin değeri önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

0,7948 olan R² değeri toplam değişimin %79,48’ünün bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca %20,52’unun modelle ifade edilemeyeceğini göstermektedir. Tablo 3.22’de gösterildiği üzere R² (0,7948) ve Adj-R² (0,6482) değerlerinin 1’e ve birbirine yakın olması modelin başarısının bir göstergesidir.

Deneyisel tasarımlara uygun olarak yapılan deneylerde elde edilen 2,5-Dimetilpirazin değerleri regresyon analizine tabi tutularak Denklem 3.4 elde edilmiştir.

$$2,5\text{-Dimetilpirazin } (\mu\text{g/kg}) \text{ (Y4)} = +7378.97 - 704.17 \cdot A + 555.67 \cdot B - 593.00 \cdot A \cdot B - 14.88 \cdot A^2 - 2480.38 \cdot B^2 \quad (3.4)$$

Y4, 2,5-Dimetilpirazin oluşumu için tahmin edilen yanıttır (predicted response). A ve B kodları sırasıyla enzim dozu ve süre yerine kullanılmıştır. Gerçeklik (authenticity), 5,879 olan adeq-precision değerine bakılarak değerlendirilmiştir. Bu değer 4'ün üstünde olması model için uygundur.

2,5-Dimetilpirazin için elde edilen eşitlik incelendiğinde A katsayısının negatif, B katsayısının pozitif değer alması enzim dozunun artırılmasıyla 2,5-Dimetilpirazin oluşumunun azaldığını uygulama süresinin artırılması ile 2,5-Dimetilpirazin oluşumunun arttığını göstermektedir.

Tablo 3.21 2,5-Dimetilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı (sum of squares)	Serbestlik derecesi (DF)	Ortalamanın karesi (mean square)	F değeri	p değeri Prop>F	
Model	2.620E+007	5	5.240E+006	5.42	0.0234	Önemli
A-Doz	2.975E+006	1	2.975E+006	3.08	0.1228	
B-Süre	1.853E+006	1	1.853E+006	1.92	0.2087	
AB	1.407E+006	1	1.407E+006	1.46	0.2668	
A ²	611.47	1	611.47	6.327E-004	0.9806	
B ²	1.699E+007	1	1.699E+007	17.58	0.0041	
Arta Kalan (Residual)	6.765E+006	7	9,664E+005			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	3.895E+006	3	1.298E+006	1.81	0.2851	Önemli değil
Hata (Pure Error)	2.870E+006	4	7.175E+005			
Düzeltilmiş Toplam	3.297E+007	12				

Tablo 3.22 2,5-Dimetilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri

Response	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Adeq-Pre	Std.Dev	Mean	%C.V.
2,5-Dimetilpirazin	0.7948	0.6482	-0.2406	5.879	983.06	6227.31	15.79

2-Asetil-3-Metilpirazin için elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.23’de gösterilmektedir. Modelin *p* değeri (0,0069) 0,05’in altındadır ve bu değer modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. 0,0633 olan uyum eksikliği değeri, öngörülen eşitliğin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda 2-Asetil-3-Metilpirazin değeri önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

0,8587 olan R² değeri toplam değişimin %85,87’ünün bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca %14,13’unun modelle ifade edilemeyeceğini göstermektedir. Tablo 3.24’de gösterildiği üzere R² (0,8587) ve Adj-R² (0,7577) değerlerinin 1’e ve birbirine yakın olması modelin başarısının bir göstergesidir.

Deneyssel tasarımlara uygun olarak yapılan deneylerde elde edilen 2-Asetil-3-Metilpirazin değerleri regresyon analizine tabi tutularak Denklem 3.5 elde edilmiştir.

$$\text{2-Asetil-3-Metilpirazin } (\mu\text{g/kg}) \text{ (Y5)} = +4263.55 + 233.00*A - 114.50*B - 634.00*A*B - 479.93*A^2 - 1109.43*B^2 \quad (3.5)$$

Y5, 2-Asetil-3-Metilpirazin oluşumu için tahmin edilen yanıttır (predicted response). A ve B kodları sırasıyla enzim dozu ve süre yerine kullanılmıştır. Gerçeklik (authenticity), 7,926 olan adeq-precision değerine bakılarak değerlendirilmiştir. Bu değer 4’ün üstünde olması model için uygundur.

2-Asetil-3-Metilpirazin için elde edilen eşitlik incelendiğinde A katsayısının pozitif, B katsayısının negatif değer alması enzim dozunun artırılmasıyla 2-Asetil-3-Metilpirazin oluşumunun arttığını uygulama süresinin artırılması ile 2-Asetil-3-Metilpirazin oluşumunun azaldığını göstermektedir.

Tablo 3.23 2-Asetil-3-Metilpirazin Yanıtı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı (sum of squares)	Serbestlik derecesi (DF)	Ortalamanın karesi (mean square)	F değeri	p değeri Prop>F	
Model	8.044E+006	5	5.240E+006	8.51	0.0069	Önemli
A-Doz	3.257E+005	1	3.257E+005	1.72	0.2308	
B-Süre	78661.50	1	78661.50	0.42	0.5395	
AB	1.608E+006	1	1.608E+006	8.50	0.0225	
A ²	6.362E+005	1	6.362E+005	3.36	0.1093	
B ²	3.399E+006	1	3.399E+006	17.97	0.0038	
Arta Kalan (Residual)	1.324E+006	7	1.891E+005			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	1.072E+006	3	3.574E+005	5.68	0.0633	Önemli değil
Hata (Pure Error)	2.517E+005	4	62919.80			
Düzeltilmiş Toplam	9.367E+006	12				

Tablo 3.24 2-Asetil-3-Metilpirazin için kuadratik modelin istatistiksel verileri

Response	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Adeq-Pre	Std.Dev	Mean	%C.V.
2-Asetil-3-Metilpirazin	0.8587	0.7577	-0.1592	7.926	434.89	3530.00	12.32

Seçilen pirazin aroma bileşenlerinin konsantrasyonunun maksimum, akrilamid seviyesinin minimum olduğu enzim uygulama şartları MKT kullanılarak tespit edilmiştir. Maksimum konsantrasyonda pirazin bileşenleri (2-Metilpirazin, 2,3-Dimetilpirazin, 2,5-Dimetilpirazin ve 2-Asetil-3-Metilpirazin) ve minimum seviyede akrilamid eldesi için en optimum enzim uygulama şartlarının (doz ve muamele süresi) 2126,4 ASNU ve 82,73 dakika olduğu bulunmuştur (istenebilirlik

değeri: 0,79). İncelenen uçucu aroma bileşenleri için 3D Yüzey Pilotları Şekil 3.12'de verilmiştir.

a)

Design-Expert® Software

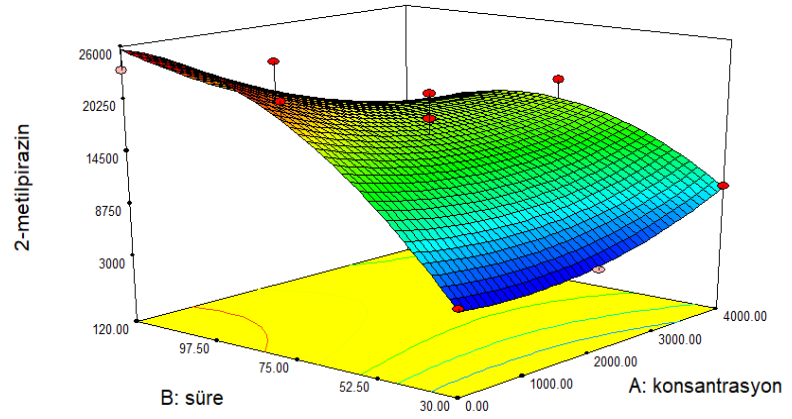
2-metilpirazin

23470

4261

X1 = A: konsantrasyon

X2 = B: süre



b)

Design-Expert® Software

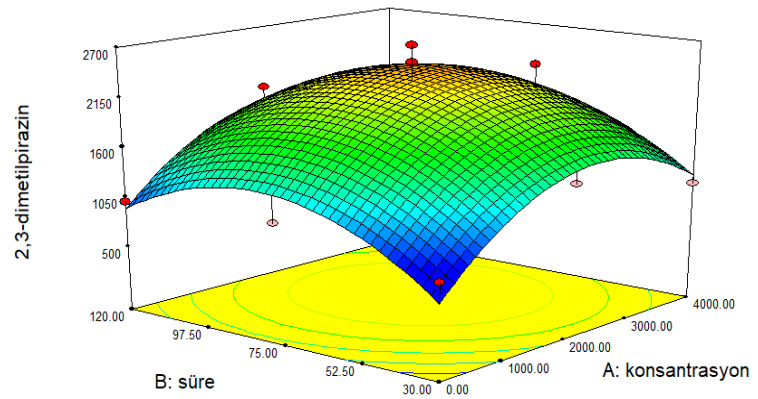
2,3-dimetilpirazin

2684

805

X1 = A: konsantrasyon

X2 = B: süre



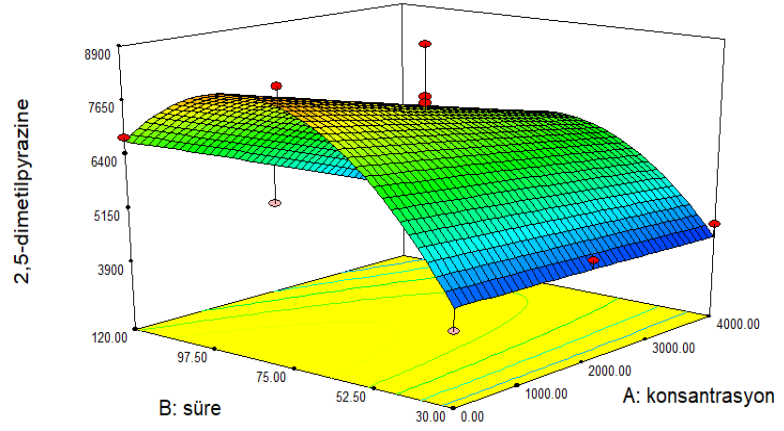
c)

Design-Expert® Software

2,5-dimetilpirazine



X1 = A: konsantrasyon
X2 = B: süre



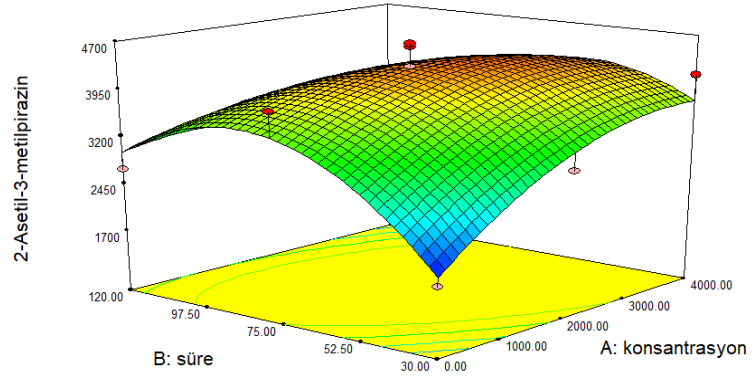
d)

Design-Expert® Software

2-Asetil-3-metilpirazin



X1 = A: konsantrasyon
X2 = B: süre



Şekil 3.12 (a) 2-Metilpirazin (b) 2,3-Dimetilpirazin (c) 2,5-Dimetilpirazin (d) 2-Asetil-3-Metilpirazin'e ait Yüzey Grafiği (3D görünümü)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında öncelikle LC-MS/MS cihazında akrilamid analizi validasyonu yapılmıştır. Yöntemin geri kazanım değeri %99,7, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,6 ve 15,5 olarak bulunmuştur. Validasyonu yapılan yöntem ile piyasada yaygın olarak satılan markalara ait Türk, dibek ve menengiç kahveleri örneklerinin akrilamid düzeyleri tespit edilmiştir. Menengiç ve dibek kahvelerinin akrilamid seviyesi ilk defa ölçülmüş ve analiz edilen kahve örneklerinin akrilamid seviyelerinin $31,1 \pm 0,6$ ile $323,4 \pm 5,4$ $\mu\text{g/kg}$ aralığında değiştiği görülmüştür. Tüm kahvelerde tespit edilen akrilamid konsantrasyonunun Avrupa Komisyonu'nun kavrulmuş kahveler için önerdiği 450 $\mu\text{g/kg}$ gösterge değerinin altında olduğu belirlenmiştir. Bu veriler, Türk halkının akrilamid maruziyetinin hesaplanması ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecektir.

Akrilamid analizinin yanı sıra örneklerde kuru madde, kül, suda çözünen madde, HMF, protein, şeker, nem, pH, renk (L^* , a^* , b^*) ve kafein analizleri yapılmış ve akrilamid konsantrasyonu ile bu parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon testi ile araştırılmıştır. Tüm kahve çeşitlerinin akrilamid konsantrasyonu ile HMF değerleri arasında, pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($r=0,698$, $p<0,01$) bulunmuştur. Kahvelerin indirgen şeker (glikoz, fruktoz) seviyesinin oldukça düşük olduğu, kahvelerin sükroz konsantrasyonu ile akrilamid miktarı arasında ise pozitif korelasyonlar saptanmıştır.

Çalışmada minimum akrilamid seviyesine sahip olan Türk kahvesi üretimi koşullarını belirlemek için yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyon yapılmıştır. Merkezi karma tasarımın yeşil kahve çekirdeklerine asparaginaz enzimi uygulama koşullarının belirlenmesi için uygun bir teknik olduğu belirlenmiştir. Asparaginaz enziminin uygulama dozunun ve süresinin kahvenin akrilamid seviyesinde önemli etkileri olduğu görülmüştür. En uygun akrilamid azaltma koşulunun 3.110,2 ASNU dozunda asparaginaz enzimiyle 80,4 dakika muamele olduğu

belirlenmiştir. Bu koşullarda üretilen kahvenin aroma profili ve duyuşal özellikleri standart işlemlerle üretilen kahve ile karşılaştırıldığında; aroma maddelerinin toplam miktarının enzim uygulanan kahvede %3,4 daha düşük olduğu ve duyuşal özellikler (kahve aroması, yanık/dumansı, kavrulmuş, meyvemsi, acılık, karamel/tatlı, genel izlenim/beğeni) açısından önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Üretilen kahvelerde toplam 61 adet aroma maddesi tespit edilmiştir. Optimum koşullarda enzim uygulanarak üretilen Türk kahvesinde tespit edilen aroma maddelerinin %30,46'sını pirazinler, %28,59'unu furanlar, %7,55'ini fenoller, %6,88'ini esterler, %4,38'ünü piroller, %4,12'sini aldehitler, %3,27'sini asitler, %3,27'sini alkoller, %2,52'sini terpenler ve terpenoitler, %2,09'unu piridinler, %0,48'ini laktonlar ve %6,89'unu diğler bileşiklerin oluşturduğu saptanmıştır. Enzim uygulanmadan üretilen Türk kahvesinde ise toplam aroma maddelerinin %29,94'ünü pirazinler, %27,22'sini furanlar, %7,57'sini fenoller, %6,65'ini esterler, %4,96'sını aldehitler, %4,36'sını piroller, %3,20'sini alkoller, %3,12'sini terpenler ve terpenoitler, %2,93'ünü asitler, %2,64'ünü piridinler, %0,71'ini laktonlar ve %6,69'unu diğler bileşiklerin oluşturduğu belirlenmiştir.

Bazı uçucu pirazin bileşenlerinin (2-Metilpirazin, 2,3-Dimetilpirazin, 2,5-Dimetilpirazin ve 2-Asetil-3-Metilpirazin) konsantrasyonunun en yüksek ve akrilamid konsantrasyonunun en düşük Türk kahvesi üretimi için asparaginaz enziminin yeşil kahve çekirdeklerine 2126,4 ASNU dozunda ve 82,73 dakika uygulaması gerektiğı belirlenmiştir (istenebilirlik değeri:0,79).

Bu çalışma kahvede akrilamid oluşum mekanizmasını ve belirlenen parametreler ile akrilamid oluşumu arasındaki korelasyonların anlaşılması açısından anlamlı veriler sunmuştur. Ayrıca akrilamid içeriğı daha düşük duyuşal özellikleri korunan bir Türk kahvesi üretmek için optimum asparaginaz enzimi uygulama koşulları önerilmiştir.

Tarım Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğünün (TAGEM) sağladığı proje bütçesi ile yürütölen bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü içinde veri teşkil etmektedir.

- Akıllıoğlu, H. G., and Gökmen, V. (2014). "Mitigation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in instant coffee by yeast fermentation", *Food Research International*, 61:252–256.
- Akşit Aşık, N. (2017). "Değişen kahve tüketim alışkanlıkları ve Türk kahvesi üzerine bir araştırma. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 5(4):310-325.
- Aktaş, R. K. (2008). Pestimet Ekmeklerinde HPLC-MS Yöntemi ile Akrilamid Tespiti. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.
- Alpözen, E. (2012). İzmir gevreğinde akrilamid düzeylerinin belirlenmesi ve pişirme koşullarının akrilamid oluşumu üzerine etkileri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir.
- Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernandes, J. O., and Oliveira, M. B. P. (2010). "Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length", *Food Chemistry*, 119(3):929-934.
- Alzahrani, H. A. S. (2011). "Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1):29-36.
- Amanpour, A., and Selli, S. (2016). "Differentiation of volatile profiles and odor activity values of Turkish coffee and French press coffee", *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5):1116-1124.
- Amrein, T. M., Andres, L., Escher, F., and Amadò, R. (2007). "Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options", *Food Additives and Contaminants*, 24(1):13-25.
- Amrein, T. M., Bachmann, S., Noti, A., Biedermann, M., Barbosa, M. F., Biedermann-Brem, S., and Amadò, R. (2003). "Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18):5556-5560.
- Amrein, T. M., Limacher, A., Conde-Petit, B., Amadò, R., and Escher, F. (2006). Influence of thermal processing conditions on acrylamide generation and browning in a potato model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16):5910-5916.
- Amrein, T. M., Schönbächler, B., Escher, F., and Amadò, R. (2004). "Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*", 52(13):4282-4288.
- Anonim (2005). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/02/20050217-3.htm>, 12 Mart 2019.

- Anonim (2013). Karbohidratların Özellikleri. Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara.
- Anonim (2018a). Türk Kahvesi Çeşitleri. <http://www.veneziakahve.com/tr/pagedetail/turk-kahvesi-cesitleri/1301>, 10 Haziran 2019.
- Anonim (2018b). Gıda ve kontrol genel müdürlüğü, kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyonu/verifikasyonu rehberi. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
- AOAC (1979). Saccharides (major) in corn syrup: liquid chromatographic method 979.23. Rockville: AOAC International.
- AOAC (2006). Protein (crude) in animal feed, combustion method, AOAC Official Method. 990.03., Rockville: AOAC International.
- Arthur, C. L., and Pawliszyn, J. (1990). "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Analytical Chemistry*, 62(19): 2145-2148.
- Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., and Tamura, G. (1972). "Production of extracellular L-asparaginases by microorganisms", *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(3):356-361.
- Arisseto, A. P., and Vicente, E. (2015). "Estimate of acrylamide intake from coffee and health risk assessment", In *Coffee in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 575-584.
- Arribas-Lorenzo G, and Morales F. J. (2010). "Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population", *Food Chemistry Toxicology*, 48(2):644-649.
- Arusoğlu, G. (2015). "Akrilamid Oluşumu ve İnsan Sağlığına Etkileri", *Akademik Gıda*, 13(1):61-71.
- Ayseli, M.T. (2015). Türk kahvesinin aroma ve aroma-aktif bileşikleri üzerine iki farklı kavurma işleminin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Baardseth, P., Blom, H., Skrede, G., Mydland, L. T., Skrede, A., and Slinde, E. (2006). "Lactic acid fermentation reduces acrylamide formation and other Maillard reactions in French fries", *Journal of Food science*, 71(1):C28-C33.
- Barter, R. (2004). "A short introduction to the theory and practice of profile roasting", *Tea and Coffee Trade Journal*, 176(9):32-41.
- Barutcu, I., Sahin, S., and Sumnu, G. (2009). "Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying", *LWT-Food Science and Technology*, 42(1):17-22.
- Başkan, S., and Erim, F. B. (2007). "NACE for the Analysis of Acrylamide in Food", *Electrophoresis*, 28(22):4108-4113.
- Bagdonaite, K., Derler, K., and Murkovic, M. (2008). "Determination of acrylamide during roasting of coffee", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15): 6081-6086.

- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., and Escher, F. (2008). "Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14):5836-5846.
- Bakhtiary, D., Asadollahi, S., and Ardakani, S. A. Y. (2013). "Determination of the Amount of Acrylamide Formation during Frying of Potato in Sesame Oil Palm Olein and the Blend of Them", *International Journal of Engineering Research and Application*, 3:210-214.
- Batool, T., Makky, E. A., Jalal, M., and Yusoff, M. M. (2016). A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178:900–923.
- Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D., and Seaman, S. W. (2003). "Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling", *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3):802-808.
- Bener, M., Akyüz, E., Şen, F. B., Başkan, K. S., Tütem, E., and Apak, M. R. (2018). "A simple automated microplate method for determining reducing sugars in food extracts and synthetic serum using cupric-neocuproine as reductant", *Turkish Journal of Chemistry*, 42(3), 794-807.
- Beşergil, B. (2019). Gaz-Sıvı Kromatografisi. http://besergil.cbu.edu.tr/26_BOLUM_9.pdf, 10 Temmuz 2019.
- Biedermann, M., Noti, A., Biedermann-Brem, S., Mozzetti, V. and Grob, K. (2002). "Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes", *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93:668–687.
- Blank I., Sen A., and Grosch, W. (1991). "Aroma impact compounds of arabica and robusta coffee. Qualitative and quantitative investigations", *Colloque Scientifique International sur le Cafe*, 117-129.
- Blank, I., Sen, A., and Grosch, W. (1992). "Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee", *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 195(3):239-245.
- Bressanello, D., Liberto, E., Cordero, C., Rubiolo, P., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., and Bicchi, C. (2017). "Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup, *Food Chemistry*, 214:218-226.
- Brown, R. (2003). Formation, occurrence and strategies to address acrylamide in food. FDA food advisory Committee Meeting on Acrylamide, 11, 24-25.
- BudryN, G., Nebesny, E., Kula, J., MaJda, T., and KrySiaK, W. (2011). "HS-SPME/GC/MS profiles of convectively and microwave roasted Ivory Coast Robusta coffee brews", *Czech Journal of Food Sciences*, 29(2):151-160.
- Buffo, R. A., and Cardelli-Freire, C. (2004). "Coffee flavour: an overview", *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2):99-104.

- Caporaso, N., Whitworth, M. B., Grebby, S., and Fisk, I. D. (2018). "Rapid prediction of single green coffee bean moisture and lipid content by hyperspectral imaging", *Journal of Food Engineering*, 227:18-29.
- Capuano, E., and Fogliano, V. (2011). "Acrylamide and 5-hydroxymethyl-furfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies", *LWT-Food Science Technology* 44(4):793–810.
- Capuano, E., Oliviero, T., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., and Fogliano, V. (2010). Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Research International*, 43(4):1021-1026.
- Castle, L. (1993). "Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41:1261–1263.
- Chu, Y. H., Kung, Y. L. (1998). "A study on vegetable oil blends", *Food chemistry*, 62(2), 191-195
- Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., Ohara-Takada, A., Matsuura-Endo, C., and Mori, M. (2003). Effects of physiological changes in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) after low temperature storage on the level of acrylamide formed in potato chips. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(5):1188-1190.
- Ciesarova, Z., Kiss, E., and Kolek, E. (2006). "Study of factors affecting acrylamide levels in model systems", *Czech journal of food sciences*, 24(3):133.
- Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K., and Hendrickx, M. E. (2005). "Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide", *Trends in Food Science & Technology*, 16(5):181-193.
- Clarke, R., and Vitzthum, O. G. (2008). Coffee: recent developments. *John Wiley & Sons*.
- Curtis, T. Y., Muttucumaru, N., Shewry, P. R., Parry, M. A., Powers, S. J., Elmore, J. S., and Halford, N. G. (2009). "Effects of genotype and environment on free amino acid levels in wheat grain: implications for acrylamide formation during processing", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1013-1021.
- Dearfield, K. L., Abernathy, C. O., Ottley, M. S., Brantner, J. H., and Hayes, P. F. (1988). "Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity", *Mutation Research/reviews in Genetic Toxicology*, 195(1):45-77.
- De Paola, E. L., Montevecchi, G., Masino, F., Garbini, D., Barbanera, M., and Antonelli, A. (2017). "Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection", *Food Chemistry*, 217:191-195.
- Deibler, K. D., Acree, T. E., and Lavin, E. H. (1999). Gas Chromatography-Olfactometry (GC/O) of Vapor Phases. *In Flavor Chemistry* (pp. 387-395). Springer, Boston, MA.

- Dr. Hochmuth (2019). Retention index guide.
https://massfinder.com/wiki/Retention_index_guide, 12 Ağustos 2019.
- Dria, G. J., Zyzak, D. V., Gutwein, R. W., Villagran, F. V., Young, H. T., Bunke, P. R., and Schafermeyer, R. G. (2007). Method for reduction of acrylamide in roasted coffee beans, roasted coffee beans having reduced levels of acrylamide and article of commerce. *U.S. Patent No. 7,220,440*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Dybing, E., and Sanner, T. (2003). "Risk assessment of acrylamide in foods", *Toxicological Sciences*, 75(1):7-15.
- EFSA (2012). Scientific report of European Food Safety Authority, Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010, Parma, Italy.
- Ehling, S., Hengel, M., and Shibamoto, T. (2005). Formation of acrylamide from lipids. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (223-233). Springer, Boston, MA.
- Eichner, K., and Karel, M. (1972). "The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 20:218–223.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Muttucumaru, N., Dodson, A. T., Parry, M. A., and Halford, N. G. (2007). "Changes in free amino acids and sugars in potatoes due to sulfate fertilization and the effect on acrylamide formation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13):5363-5366.
- Eriksson, S. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. Doctoral thesis, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden.
- Erşan, M., and Açikel, Ü. R. (2014). "Delemar'ın asit fosfataz üretimi ve Zn biyobirikiminin cevap yüzey yöntemi kullanarak optimize edilmesi", *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(2), 321-329.
- Eurachem Guide (1998). The fitness for purpose of analytical methods-a laboratory guide to method validation and related topics.
<http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>.
- Exon, J. H. (2006). "A review of the toxicology of acrylamide", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(5):397-412.
- Farah, D. M. H., and Zaibunnisa, A. H. (2012). "Optimization of cocoa beans roasting process using response surface methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide", *International Food Research Journal* 19(4):1355-1359.
- Fikry, M., Yusof, Y. A., Al-Awaadh, A. M., Rahman, R. A., Chin, N. L., Mousa, E., and Chang, L. S. (2019). "Effect of the Roasting Conditions on the Physico-chemical, Quality and Sensory Attributes of Coffee-Like Powder and Brew from Defatted Palm Date Seeds", *Foods*, 8(2):61.

- Fisk, I. D., Kettle, A., Hofmeister, S., Virdie, A., and Kenny, J. S. (2012). "Discrimination of roast and ground coffee aroma", *Flavour*, 1:14.
- Friedman, M. (2003). "Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A Review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4504-4526.
- Friedman, M., and Levin, C. E. (2008). "Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15):6113-6140.
- FSA (2012). A rolling programme of surveys on process contaminants in UK retail foods, Acrylamide & Furan: Survey 4.
- Garba, Z. N., and Rahim, A. A. (2014). Process optimization of K₂C₂O₄-activated carbon from *Prosopis africana* seed hulls using response surface methodology. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 107:306-312.
- Geng, Z., Jiang, R. and Chen, M. (2008). "Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography", *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:178-182.
- Gertz, C., and Klostermann, S. (2002). "Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(11):762-771.
- Girma, K. B., Lorenz, V., Blaurock, S., and Edelmann, F. T. (2005). "Coordination chemistry of acrylamide", *Coordination Chemistry Reviews*, 249:1283–1293.
- Govaert, Y., Ariseto, A., Van Loco, J., Scheers, E., Fraselle, S., Weverbergh, E., and Goeyens, L. (2006). "Optimisation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods", *Analytica chimica acta*, 556(2):275-280.
- Gök, İ. (2018). Topraktan fincana kahvenin serüveni. <http://www.gastrofests.com/topraktan-fincana-kahvenin-seruveni/>, 25 Mayıs 2019.
- Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Köksel, H., and Acar, J. (2007). "Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies", *Food Chemistry*, 104(3):1136-1142.
- Gökmen, V., and Şenyuva, H. Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 103:196-203.
- Gökmen, V., Palazoğlu, T. K., and Şenyuva, H. Z. (2006). "Relation between the acrylamide formation and time–temperature history of surface and core regions of French fries", *Journal of Food Engineering*, 77(4):972-976.
- Granvogl, M., and Schieberle, P. (2006). "Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16):5933-5938.
- Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T., and Stadler, R. H. (2007). "Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction", *Food Additives and Contaminants*, 24(1):60-70.

- Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., and Axmon, A. (2001). "Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose", *Scandinavian Journal of Work Environment and Health*, 27(4):219-226.
- Hashim, L., and Chaveron, H. (1995). "Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting", *Food Research International*, 28(6):619-623.
- Hattox, R. S. (1996). *Kahve ve Kahvehaneler. Bir Toplumsal İçeceğin Yakındoğu'daki Kökenleri*. Tarih Vakfı Yurt Yayınları, İstanbul.
- Henderson, J. W., Ricker, R. D., Bidlingmeyer, B. A., and Woodward, C. (2000). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent, 1100:1-10.
- Hendriksen, H. V., Budolfson, G., and Baumann, M. J. (2013). "Asparaginase for acrylamide mitigation in food", *Aspects of Applied Biology*, 116:41-50.
- Hogervorst, J. G., Schouten, L. J., Konings, E. J., Goldbohm, R. A., and van den Brandt, P. A. (2008). "Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5):1428-1438.
- IARC (1994). *Acrylamide in some industrial/chemicals; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; International Agency for research on cancer: Lyon, France*, 60:389-433.
- Illy, A., and Viani, R. (2005). *Espresso Coffee: The Science of Quality*: Elsevier Academic.
- JECFA (2005). *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf.
- Jin, Y., Pan, X., and Fu, Z. (2014). "Exposure to bifenthrin causes immuno-toxicity and oxidative stress in male mice", *Environmental Toxicology*, 29(9):991-999.
- Jokanović, M. R., Džinić, N. R., Cvetković, B. R., Grujić, S., and Odžaković, B. (2012). "Changes of physical properties of coffee beans during roasting. *Acta Periodica Technologica*", 43:21-31.
- Jung, M., Choi, D., and Ju, J. (2003). "A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries", *Food Chemistry and Toxicology*, 68:1287-1290.
- Kelly, J., Chapman, S., and Brereton, P. (1999). "Gas Chromatographic Determination of Volatile Congeners in Spirit Drinks: Interlaboratory Study", *Journal of AOAC International*, 82(6):1375-1388.
- Kıvançlı, J., and Elmacı, Y. (2014). "Türk Kahvesinin Lezzetini Oluşturan Uçucu Bileşenlerin Belirlenmesinde Uygun Yöntemin Seçilmesi", *Akademik Gıda*, 12(3).

- Kita, A., Bråthen, E., Knutsen, S. H., and Wicklund, T. (2004). "Effective ways of decreasing acrylamide content in potato crisps during processing", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23):7011-7016.
- Knopp, S., Bytof, G., and Selmar, D. (2006). "Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans", *European Food Research and Technology*, 223(2):195.
- Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N., Hamzalıoğlu, A., and Gökmen, V. (2012). "In depth study of acrylamide formation in coffee during roasting: role of sucrose decomposition and lipid oxidation", *Food & Function*, 3(9), 970-975.
- Koç, B., and Kaymak-Ertekin, F. (2010). "Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları", *GIDA*, 35(1):1-8.
- Konings, E. J. M., Baars, A. J., Van Klaveren, J. D., Spanjer, M. C., Rensen, P. M., Hiemstra, M., and Peters, P. W. J. (2003). "Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks", *Food and Chemical Toxicology*, 41(11):1569-1579.
- Krishnakumar, T., and Visvanathan, R. (2014). "Acrylamide in food products: A review", *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7):1.
- Kroeplien, U. (1974). "Monosaccharides in roasted and instant coffees", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 22(1):110-116.
- Kukurova, K., Ciesarova, Z., Bednarikova, A., and Marková, L. (2009). "Effect of inorganic salts on acrylamide formation in cereal matrices", *Czech Journal of Food Sciences*, 27(special issue), S425-S428.
- Kumar, J., Das, S., and Teoh, S. L. (2018). "Dietary acrylamide and the risks of developing cancer: Facts to ponder", *Frontiers in nutrition*, 5, 14.
- Kuzucu, K. and Koz, M. S. (2015). *Türk Kahvesi*. Yapı Kredi Yayınları.
- Lantz, I., Ternité, R., Wilkens, J., Hoenicke, K., Guenther, H., and van der Stegen, G. H. (2006). "Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee", *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(11), 1039-1046.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., and Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150(1):1-26.
- Lee, K. J., Lee, G. H., Kim, H., Oh, M. S., Chu, S., Hwang, I. J., and Park, H. M. (2015). "Determination of heterocyclic amines and acrylamide in agricultural products with liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Toxicological Research* 31(3):255.
- Lerner, S. E., Seghezzo, M. L., Molfese, E. R., Ponzio, N. R., Cogliatti, M., and Rogers, W. J. (2006). "N-and S-fertiliser effects on grain composition, industrial quality and end-use in durum wheat", *Journal of Cereal Science*, 44(1): 2-11.
- Leung, K. S., Lin, A., Tsang, C. K., and Yeung, S. T. K. (2003). "Acrylamide in asian foods in Hong Kong". *Food additives and contaminants*, 20(12):1105-1113.

- Lingnert, H., Grivas, S., Jägerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., and Åman, P. (2002). "Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods", *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46(4): 159-172.
- Liu, Z. M., Tse, L. A., Ho, S. C., Wu, S., Chen, B., Chan, D., and Wong, S. Y. S. (2017). Dietary acrylamide exposure was associated with increased cancer mortality in Chinese elderly men and women: a 11-year prospective study of Mr. and Ms. OS Hong Kong. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 143(11):2317-2326.
- Liu, C., Yang, N., Yang, Q., Ayed, C., Linforth, R., and Fisk, I. D. (2019). "Enhancing Robusta coffee aroma by modifying flavour precursors in the green coffee bean", *Food Chemistry*, 281:8-17.
- LoPachin, R. M. (2004). "The changing view of acrylamide neurotoxicity", *Neurotoxicology*, 25(4):617-630.
- Lopez-Galilea, I., Fournier, N., Cid, C., and Guichard, E. (2006). "Changes in head-space volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22):8560-8566.
- Ludwig, I. A., Sánchez, L., De Peña, M. P., and Cid, C. (2014). "Contribution of volatile compounds to the antioxidant capacity of coffee", *Food Research International*, 61:67-74.
- Lynglev, G. B., and Schoesler, S. (2016). Method for Producing Roasted Coffee Beans. U.S. Patent Application No. 14/777,618.
- Madihah, K. K., Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Rozita, O., and Misnawi, J. (2012). "Optimization of roasting conditions for high-quality robusta coffee", *APCBEE Procedia*, 4:209-214.
- Manini, P., d'Ischi, M., and Prota, G. (2001). "An unusual decarboxylative Maillard reaction between l-DOPA and d-glucose under biomimetic conditions: Factors governing competition with Pictet–Spengler condensation", *The Journal of Organic Chemistry*, 66(15):5048-5053.
- Marková, L., Ciesarová, Z., Kukurová, K., Zieliński, H., Przygodzka, M., Bednariková, A., and Šimko, P. (2012). "Influence of various spices on acrylamide content in buckwheat ginger cakes", *Chemical Papers*, 66(10): 949-954.
- Marin, K., Pozl, T., Zlatic, E., and Plestenjak, A. (2008). "A New Aroma Index to Determine the Aroma Quality of Roasted and Ground Coffee During Storage", *Food Technology Biotechnology*, 46(4):442-447.
- Martin, F. L., and Ames, J. M. (2001). "Formation of Strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:3885–3892.
- Miao, Y., Zhang, H., Zhang, L., Wu, S., Sun, Y., Shan, Y., and Yuan, Y. (2014). "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in reconstituted potato chips during frying", *Journal of Food Science Technology*, 51(12):4005-4011

- Mizukami, Y., Yoshida, M., Isagawa, S., Yamazaki, K., and Ono, H. (2014). "Acrylamide in roasted barley grains: presence, correlation with colour and decrease during storage", *Food Additives Contaminants Part A*, 31(6):995–1000.
- Mojska, H., and Gielecinska, I. (2013). "Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions", *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(3).
- Mojska, H., Gielecińska, I., Szponar, L., and Ołtarzewski, M. (2010). "Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population", *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9):2090-2096.
- Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P. Q., Dugo, P., Lo Presti, M., Festa, S., and Dugo, G. (2005). "Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with the support of a dual-filter mass spectra library", *Journal of Separation Science*, 28(9-10):1101-1109.
- Moon, J. K., and Shibamoto, T. (2009). "Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13):5823-5831.
- Muchtaridi, M., Levita, J., Rahayu, D., and Rahmi, H. (2012). "Influence of using coconut, palm, and corn oils as frying medium on concentration of acrylamide in fried tempe", *Food and Public Health*, 2(2):16-20.
- Mulla, M. Z., Bharadwaj, V. R., Annapure, U. S., and Singhal, R. S. (2011). "Effect of formulation and processing parameters on acrylamide formation: A case study on extrusion of blends of potato flour and semolina", *LWT-Food Science and Technology*, 44(7):1643-1648.
- Murkovic, M., and Bornik, M. A. (2007). "Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee", *Molecular Nutrition Food Research*, 51(4):390–394.
- Murkovic, M., and Derler, K. (2006). "Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(1-2): 25-32.
- Murthy, P. S. and Manonmani, H. K. (2009). "Physico-chemical, antioxidant and antimicrobial properties of Indian monsooned coffee", *European Food Research and Technology*, 229:645-650.
- Muttucumaru, N., Halford, N. G., Elmore, J. S., Dodson, A. T., Parry, M., Shewry, P. R., and Mottram, D. S. (2006). "Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23):8951-8955.
- Novozymes (2018). Acrylamide mitigation in coffee using Novozymes Acrylaway Technical Document.

- Nasiri Esfahani, B., Kadivar, M., Shahedi, M., and Soleimanian-Zad, S. (2017). "Reduction of acrylamide in whole-wheat bread by combining lactobacilli and yeast fermentation", *Food Additives & Contaminants: A*, 34(11):1904-1914.
- Obón-Santacana, M., Freisling, H., Peeters, P. H., Lujan-Barroso, L., Ferrari, P., Boutron-Ruault, M. C., and Boeing, H. (2016). "Acrylamide and glycidamide hemoglobin adduct levels and endometrial cancer risk: a nested case-control study in nonsmoking postmenopausal women from the EPIC cohort", *International Journal of Cancer*, 138(5):1129-1138.
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobayashi, H., and Yoshida, M. (2003). "Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods", *Food Additives and Contaminants*, 20:215-220.
- Ölmez, H., Tuncay, F., Özcan, N., and Demirel, S. (2008). "A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(7):564-568.
- Özgür, N. (2019). *Türk Kahvesi Standartları ve Pişirme Ekipmanları Teknik Analizi. Türk Kahvesi Kültürü ve Araştırmaları Derneği.*
- Pal Murugan, M., Agathian, G., Semwal, A. D., and Sarma, G. K., (2016). "A Review on Acrylamide Mitigation Strategies in Various Processed Foods", *International Journal of Advanced Research*, 4(7):1025-1040.
- Park, J. H., and Penning, T. M. (2009). Polyaromatic hydrocarbons. In: Stadler RH, Lineback DR, editors. *Processinduced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Pedreschi, F., Kaack, K., and Granby, K., (2004). "Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying", *LWT-Food Science and Technology*, 37(6): 679-685.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K., and Granby, K., (2005). "Color changes and acrylamide formation in fried potato slices", *Food Research International*, 38(1):1-9.
- Pedreschi, F., (2009). "Acrylamide formation and reduction in fried Potatoes", *Processing effects on safety and quality of foods*, 310:231-251.
- Petisca, C., Pérez-Palacios, T., Farah, A., Pinho, O., and Ferreira, I. M. (2013). "Furans and other volatile compounds in ground roasted and espresso coffee using headspace solid-phase microextraction: Effect of roasting speed", *Food and Bioproducts Processing*, 91(3):233-241.
- Poisson, L., Schmalzried, F., Davidek, T., Blank, I., and Kerler, J. (2009). "Study on the role of precursors in coffee flavor formation using in-bean experiments" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21):9923-9931.
- Pourshahidi, L. K., Navarini, L., Petracco, M., and Strain, J. J. (2016). "A comprehensive overview of the risks and benefits of coffee consumption", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15:671-684.

- Powers, S. J., Mottram, D. S., Curtis, A. and Halford, N. G. (2013). "Acrylamide concentrations in potato crisps in Europe from 2002 to 2011", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(9):1493-1500.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2014). *Processing and impact on active components in food*. Academic Press, London.
- Prodoliet, J., and Bruehlhart, M. (1993). "Determination of acesulfam-K in foods", *Journal of AOAC International*, 76(2):268-274.
- Prodoliet, J., Bruehlhart, M., Lador, F., Martinez, C., Obert, L., Blanc, M. B., and Parchet, J. M. (1995). "Determination of free and total carbohydrate profile in soluble coffee", *Journal of AOAC International*, 78(3):749-761.
- Racineux, S., and Tran, C. L. (2018). *Kim Korkar Kahveden? İstanbul: Nail Kitapevi*; 112-113.
- Rattan, S., Parande, A. K., Nagaraju, V. D., and Ghiwari, G. K. (2015). "A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing", *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9):6461-6472.
- Razia, S., Bertrand, M., Klaus, V., and Meinolf, G. L. (2016). "Investigation of acrylamide levels in branded biscuits, cakes and potato chips commonly consumed in Pakistan", *International Food Research Journal*, 23(5).
- Roach, J. A., Andrzejewski, D., Gay, M. L., Nortrup, D. and Musser, S.M. (2003). "Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51(26):7547-7554.
- Rood, D. (1998). "Gas Chromatography Problem Solving and Troubleshoot", *Journal of Chromatography Science* 35:379-380.
- Rubayiza, A. B., and Meurens, M. (2005). "Chemical discrimination of Arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12):4654-4659.
- Saboktakin, M. R. (2012). *Acrylamide, Synthesis and Properties*. *Advances in Chemistry Research*.
- Sağcan, N., (2016). Yeşil çaydan L-teanin ekstraksiyon optimizasyonu ve saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Samsonowicz, M., Regulska, E., Karpowicz, D., ve Leśniewska, B., (2019). "Antioxidant properties of coffee substitutes rich in polyphenols and Minerals", *Food Chemistry*, 278:101-109.
- Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., and Escher, R. (2002). "Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds In coffee beans", *Journal of food science*, 67(1):60-66.
- Seal, C. J., De Mul, A., Eisenbrand, G., Haverkort, A. J., Franke, K., Lalljie, S. P. D., and Tuijelaars, S., (2008). "Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods—a case study on potatoes, cereals and coffee", *British Journal of Nutrition*, 99(S2):S1-S46.

- Seçilmiş, S. S., Yanık, D. K., and Göğüş, F., (2015). "Processing of a novel powdered herbal coffee (*PistaciaTerebinthus* L. Fruits Coffee) and its sensorial properties", *Journal of Food Science Technology*, 52(7):4625-4630.
- Semla, M., Goc, Z., Martiniaková, M., Omelka, R., and Formicki, G., (2017). "Acrylamide: A common food toxin related to physiological functions and health", *Physiological Research*, 66(2):205.
- Shaki, F., Hosseini, M. J., Ghazi-Khansari, M., and Pourahmad, J., (2012). "Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(12):1940-1950.
- Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., and Van Landingham, C., (2006). "Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects", *Critical Reviews in Toxicology*, 36(6-7):481-608.
- Sickles, D. W., Brady, S. T., Testino, A., Friedman, M. A. and Wrenn, R. W. (1996). "Direct effect of the neurotoxicant acrylamide on kinesin-based microtubule motility", *Journal of Neuroscience Research*, 46(1):7-17.
- Skog, K., and Alexander, J., (2006). *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. Woodhead Publishing.
- Sohn, M., and Ho, C. T., (1995). "Ammonia generation during thermal degradation of amino acids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:3001-3003.
- Stadler, R. H., and Scholz, G., (2004). "Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control", *Nutrition Reviews*, 62:449-467.
- Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J., and Blank, I., (2004). "In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction", *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52:5550–5558.
- Stadler, R. H., and Studer, A., (2015). "Acrylamide Formation Mechanisms", *Acrylamide in food: analysis, content and potential health effects*. Elsevier, London, 1-17.
- Studer, A., Blank, I., and Stadler, R. H., (2004). "Thermal processing contaminants in foodstuffs and potential strategies of control", *Czech Journal of Food Sciences*, 22(1):1.
- Stadler, R. H., Verzegnassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S., and Schilter, B., (2003). "Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems", *Chemical Research in Toxicology*, 16(10):1242-1250.
- Stojanovska, S., and Tomovska, J., (2015). "Factors influence to formation of acrylamide in food", *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 13:10-15.

- Summa, C. A., de la Calle, B., Brohee, M., Stadler, R. H., and Anklaam, E., (2007). "Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide", *LWT-Food Science Technology*, 40(10): 1849–1854.
- Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., and Åman, P., (2004). "Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7):2047-2051.
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenäs, K. E., Lind, Y., and Rosen, J. (2003). "Dietary intake of acrylamide in Sweden", *Food and Chemical Toxicology*, 41(11):1581-1586.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., and Lindblom, M., (2004). "A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5):323-347.
- Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., and Maitani, T., (2003). "Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching", *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 44:89–95.
- Tardiff, R. G., Gargas, M. L., Kirman, C. R., Carson, M. L., and Sweeney, L. M., (2010). "Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans", *Food and Chemical Toxicology*, 48(2):658-667.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., and Törnqvist, M., (2002). "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17):4998-5006.
- Tareke, E. (2003). Identification and origin of potential background carcinogens: Endogenous isoprene and oxiranes, dietary acrylamide, Doctoral dissertation, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden.
- Tawfik, M. S., and El-Ziney M. G. (2008). "Acrylamide levels in selected foods in Saudi Arabia with reference to health-risk assessment of dietary acrylamide intake", *American Journal Food Technology*, 3:347–353.
- Teranishi, R., and Kint, S. (1993). Sample preparation. *In Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*; Acree, T. E., Teranishi, R., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, pp. 137-168.
- Tin, W. Y. (2006). Study of acrylamide formation in coffee during roasting. Kolej Universiti Kejuruteraan and Teknologi Malaysia.
- Tressl, R. (1989). Formation of flavor components in roasted coffee. *Thermal Generation of Aromas*, pp. 285-301.
- Türk Standart Enstitüsü (TSE) (2010). Kahve Öğütülmüş, TS 13423. Ankara: Institute of Turkish Standards.
- Turan, M.D., and Altundoğan, H.S. (2011). "Hidrometalurjik Araştırmalarda Yanıt Yüzey Yöntemlerinin (YYY) kullanımı", *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 50(3):11-23.

- Umano, K., and Shibamoto, T. (1987). "Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 35:909-912.
- Ülger, N. (2015). Türk Kahvesi ve Bazı Hazır Kahve Karışımlarının Total Fenol İçeriği ve Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- Vass, M., Amrein, T. M., Schonbachler, B., Escher, F., and Amado, R. (2004). "Ways to reduce the acrylamide formation in cracker products", *Czech Journal of Food Sciences*, 22(1):19.
- Viklund, G. Å., Olsson, K. M., Sjöholm, I. M., and Skog, K.I. (2010). "Acrylamide in crisps: Effect of blanching studied on long-term stored potato clones", *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(2):194-198.
- Vimal, A., and Kumar, A. (2017). "In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase", *Enzyme and Microbial Technology*, 98:9-17.
- Vorlova, L., Borkovcova, I., Kalabova, K., and Vecerek, V. (2006). "Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method", *Journal of Food Nutrition Research* 45(1):34-38.
- Vural, G. (2016). Gıdaların işlenmesi sırasında ortaya çıkan reaksiyonlar. <http://www.vuralgokmen.com/wp-content/uploads/GMU202-Set-3.pdf>, 6 Nisan 2019.
- Wang, H., Huang, P., Lie, T., Li, J., Hutz, R. J., Li, K., and Shi, F., (2010). Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 29(2):225-230.
- Wanyika, H. N., Gatebe, E. G., Gitu, L. M., Ngumba, E. K., and Maritim, C. W. (2010). "Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market", *African Journal of Food Science*, 4(6):353-358.
- Wenzl, T., De La Calle, M. B., and Anklam, E. (2003). "Analytical methods or the determination of acrylamide in food products: a review", *Food Additives and Contaminants*, 20(10):885-902.
- Whittaker, A., Marotti, I., Dinelli, G., Calamai, L., Romagnoli, S., Manzelli, M., and Benedettelli, S. (2010). "The influence of tuber mineral element composition as a function of geographical location on acrylamide formation in different Italian potato genotypes", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12):1968-1976.
- Wilson, K. M., Giovannucci, E., Stampfer, M. J., and Mucci, L. A. (2012). "Dietary acrylamide and risk of prostate cancer", *International Journal of Cancer*, 131(2), 479-487.
- Wong, K. H., Abdul Aziz, S., and Mohamed, S. (2008). "Sensory aroma from Mailard reaction of individual and combinations of amino acids with glucose in acidic conditions", *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1512-1519.

- World Health Organization (WHO) (2002). FAO/WHO Consultation of the Health Implications of Acrylamide in Food, Summary Report of a Meeting Held in Geneva, 25–27 June 2002.
- Xu, F. (2018). Acrylamide mitigation in coffee by asparaginase application. Doctoral dissertation, University of Reading.
- Yılmaz, B., Acar-Tek, N., and Sözlü, S. (2017). “Turkish cultural heritage: a cup of coffee”, *Journal of Ethnic Foods*, 4(4):213-220.
- Yılmaz, E., Oraman, Y., Özdemir, G., Arap, S., and Yılmaz, İ. (2016). Türk Kahvesi Tüketim Eğilimleri ve Tüketici Özelliklerinin Belirlenmesi. XII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi, Isparta, Kongre Kitabı, 457-473.
- Yang, X., and Peppard, T. (1994). “Solid Phase Microextraction for Flavor Analysis”, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42:1925-1930.
- Yaylayan, V. A., Locas, C. P., Wronowski, A., and O'Brien, J. (2005). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In: Friedman M, Mottram DS, editors. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. New York: Springer; 191–204.
- Yıldız, O., Şahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö. and Kolaylı, S. (2010). “Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi, Akademik Gıda, 8(6), 44-51.
- Yousef, M. I., and El-Demerdash, F. M. (2006). “Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats”, *Toxicology*, 219(1-3):133-141.
- Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M., and Shaki, F. (2017). “A review of acrylamide toxicity and its mechanism”, *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(1):1-7.
- Zhang, Y., and Zhang, Y. (2007). “Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47:521-542.
- Zhang, Y., Zhang, G., and Zhang, Y. (2005). “Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods; review and recent developments”, *Journal of Chromatography A*, 1075:1-21.
- Zhang, Z., and Pawliszyn, J. (1995). “Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device”, *Analytical Chemistry*, 67(1):34-43.
- Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J., and Corke, H. (2010). “Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effects on acrylamide formation”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13):2254-2262.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., and Villagran, M. D. (2003). “Acrylamide formation mechanism in heated foods”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4782-4787.

İletişim Bilgisi: banu.akgun@tarimorman.gov.tr

Makaleler

1. Akgün, B., & Arıcı, M. (2019). Evaluation of acrylamide and selected parameters in some Turkish coffee brands from the Turkish market. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(4), 548-560. (SCI)

Konferans Bildirileri

1. Akgün, B. & Arıcı, M. (2018). Prevention of Acrylamide Formation in Turkish coffee. 4. Adriyatik'ten Kafkaslar'a Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 19-21 Nisan 2018, Girne, Kıbrıs (Poster Sunumu)
2. Akgün, B. & Arıcı, M. (2019). Determination of Acrylamide Level in Some Traditional Turkish Coffees (Dibek & Menengic) by LC-MS/MS. 18. Uluslararası Katılımlı Kromatografi Kongresi, 15-18 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye (Sözlü Sunum)
3. Akgün, B. & Arıcı, M. (2019). Evaluation of correlations between acrylamide concentration and some selected parameters in Turkish coffees. 4. Uluslararası Anadolu Tarım Gıda Çevre ve Biyoloji Kongresi, 20-22 Nisan 2019, Afyonkarahisar, Türkiye (Sözlü Sunum)
4. Akgün, B. & Karaağaç, H.E. (2019). Carbohydrate Contents in Commercial Traditional Turkish Coffees. 4. Uluslararası Anadolu Tarım Gıda Çevre ve Biyoloji Kongresi, 20-22 Nisan 2019, Afyonkarahisar, Türkiye (Poster Sunumu)

Projeler

1. TAGEM Projesi. Türk Kahvesinin Akrilamid İçeriği ile Asparaginaz Enziminin Akrilamid Oluşumu ve Uçucu Bileşikler Profiline Etkileri (TAGEM/HSGYAD/A/18/A3/P1/174).