

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA ÜRÜNLERİNDE ŞEKER YERİNE KULLANILAN
DOĞAL VE SENTETİK MADDELERİN ANALİZİ İÇİN
YENİ YÖNTEM GELİŞTİRMEK**

MUHARREM YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSEYİN AFŞAR**

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA ÜRÜNLERİNDE ŞEKER YERİNE KULLANILAN DOĞAL
VE SENTETİK MADDELERİN ANALİZİ İÇİN YENİ YÖNTEM
GELİŞTİRMEK**

Muharrem YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 17.10.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Adnan AYDIN
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. İkbâl KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Tez konusunun seçilmesinde, yönlendirilmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük desteğini gördüğüm, karşılaştığım her türlü zorlukta zekası, bilgisi, tecrübesi ve hoşgörüsü ile beni yalnız bırakmayan bana hem bilimsel hem de manevi açıdan destek olan değerli hocam Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR'a,

Tez çalışmamın ve iş hayatımın her aşamasında büyük yardımını gördüğüm anlayışı, uyumu ve fikirlerini paylaşan, çalışma performansı ile her zaman örnek olan değerli ağabeyim bilim insanı Sayın Mehmet KIRBIYIK'a,

İş hayatımda ve çalışmamda destek ve yardımlarını gördüğüm Laboratuvar Müdürümüz Sayın Yaşar ÇİFTÇİ'ye ve Gıda Birimindeki Kimyager ve Laborant çalışma arkadaşlarıma,

Tez izleme komitelerinde katkıları ve yapıcı eleştirileri ile destek sağlayan Prof. Dr. Sıdika SUNGUR ve Prof. Dr. Reşat APAK'a,

Tezimi okuyup değerlendiren ve yapıcı eleştirileri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Adnan AYDIN ve Doç.Dr. İkbâl KOYUNCU'ya,

Bugüne kadar bana karşı desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme, kayınvalideme, rahmetli kayınpederime, Zeynep ve Ali ÇİMEN'e

Yıllardır yoğunluğuma sabreden, çalışmalarımındaki en büyük destekçim olan eşim Reyhan'a ve oğlum Mert'e, En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma İstanbul Sanayi Odası (İSO) tarafından desteklenmiştir.

Kasım, 2011

Muharrem YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	xi
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Bulgular	4
BÖLÜM 2	
KARBOHİDRATLAR	5
2.1 Monosakkaritler	6
2.2 Disakkaritler	6
2.3 Oligosakkaritler	7
2.4 Polisakkaritler	7
2.4.1 Nişasta	8
2.4.1.1 Nişasta türevleri	9
BÖLÜM 3	
TATLANDIRICILAR	11
3.1 Tatlandırıcıların Sınıflandırılması	15
3.1.1 Aspartam	17
3.1.2 Sakarin	21

3.1.3	Asesulfam K	24
3.1.4	Siklamat	25
3.1.5	Sukraloz	27
3.1.6	Taumatın	28
3.1.7	Neohesperidin Dihidrokalson (NHDC).....	28
3.1.8	Alitam	29
3.1.9	Steviosit	29
3.1.10	Neotam.....	30
3.2	Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları.....	30
BÖLÜM 4		
	ÜZÜM ve PEKMEZ	32
4.1	Üzüm ve Şıranın Bileşimi	32
4.1.1	Üzümün Çeşitli Kısımlarının Bileşimi	32
4.1.2	Şıranın Bileşimi	33
4.1.2.1	Karbohidratlar	34
4.1.2.2	Asitler.....	35
4.1.2.3	Mineral Maddeler (Kül).....	36
4.1.2.4	Azotlu Maddeler	36
4.1.2.5	Renk Maddeleri.....	37
4.1.2.6	Fenolik Maddeler	37
4.1.2.7	Lipidler.....	38
4.1.2.8	Aroma Maddeleri	38
4.1.2.9	Enzimler	39
4.1.2.10	Vitaminler.....	40
4.2	Pekmez.....	40
4.2.1	Pekmez Üretimi	41
4.2.2	Sıvı Pekmez Yapımı	41
4.2.2.1	Tatlı Sıvı Pekmez Yapımı	41
4.2.2.2	Ekşi Sıvı Pekmez Yapımı	44
4.2.3	Katı Pekmez Yapımı.....	44
BÖLÜM 5		
	KROMATOĞRAFİ	45
5.1	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	48
5.1.1	HPLC Sistemleri.....	48

5.1.2	HPLC Kullanım Alanları.....	49
5.1.2.1	Normal Faz Kromatografisi	50
5.1.2.2	Ters Faz Kromatografisi	50
5.2	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	50
5.2.1	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (YPİTK)	53
5.2.2	Kromatogramın Tanımlanması ve Görselleştirilmesi.....	54
BÖLÜM 6		
	İZOTOPIK ANALİZ	56
6.1	Gıda Ürünleride Orjinallik (Authenticity) Tayini	56
6.2	Kararlı İzotopların Analizi	57
6.3	Hidrojen ve Oksijen: Doğal İzotopik Fraksiyonlaşma.....	58
6.3.1	Buharlaşmaya Etki Eden Faktörler	58
6.3.1.1	Meteorolojik Faktörler	59
	Güneş Radyasyonu.....	59
	Hava Buhar Basıncı	59
	Sıcaklık	59
	Rüzgar	59
	Basınç.....	59
6.3.1.2	Coğrafik ve Topoğrafik Faktörler	60
	Enlem	60
	Yükseklik	60
	Bakı	60
6.3.1.3	Suyun Kalitesi ve Bulunduğu Ortam	61
	Su Kütlesinin Büyüklüğü	61
	Tuz Durumu	61
	Kirlenme	61
6.4	Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR®).....	62
6.4.1	İzotop Bolluk ve İzotopik Oran:	64
6.5	İzotop Oranı-Kütle Spektroskopisi (IR-MS).....	66
6.5.1	Oksijen ve Hidrojen	67
6.5.2	Karbon	67
6.5.2.1	Kalvin Döngüsü Metabolizması	68
6.5.2.2	Hatch-Slack Metabolizması	68
	Metabolizmanın İşleyişi	69

6.5.2.3	Krassulasean asit metabolizması.....	69
6.5.3	IRMS'in Temel Prensipleri	70
6.5.3.1	Numune Hazırlama ve Arayüz Cihazları	70
6.5.3.2	Sürekli Akış IRMS.....	70
	(Gaz Kromatografi-Yanma)-IRMS ((GC-C)-IRMS).....	71
BÖLÜM 7		
	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	73
7.1	Deneyisel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	73
7.2	Deneyisel Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sistemler.....	73
7.3	Deneyisel Çalışmada Kullanılan Diğer Yardımcı Aletler.....	75
7.4	Analiz Edilen Örnekler	75
7.4.1	Aspartam ve Sodyum Sakarin İlavesi Yapılan Örnekler	75
7.4.2	Pekmez Numuneleri	75
7.4.3	Üzüm Numuneleri	76
7.4.4	Pekmez Numunelerine Tağşiş Adına İlave Edilebileceği Düşünülen Tatlandırıcılar	77
7.4.5	Tatlandırıcı İlavesiyle Kirletilen (Tağşiş) Yapılan Örnekler.....	77
7.5	Deneyisel Çalışmalar	77
7.5.1	Tatlandırıcıların İTK ile Analizleri.....	77
7.5.1.1	Analiz Yapılacak Plaka Cinsinin Tespit Edilmesi	78
7.5.1.2	Plakaya Uygulama Yapılmadan Önceki Önlemler	78
7.5.1.3	Uygulama İşlemi Tekniğinin Belirlenmesi ve Uygulamanın Yapılması.....	79
7.5.1.4	Plakaya Yapılan Uygulamanın Manuel veya Otomatik Yürütülmesi... ..	79
7.5.1.5	Plaka Üstündeki Standart ve Numunelerin Direk veya Türevlendirildikten Sonra Değerlendirilmesi	79
7.5.2	Aspartam Analizi İçin Yapılan Çalışmalar.....	79
7.5.2.1	Aspartam Lekelerinin Değerlendirilmesi Koşullarının Belirlenmesi	80
7.5.2.2	İnce Tabaka Üzerinde Meydana Gelen İstenmeyen Renklenmenin Giderilmesi	80
7.5.2.3	Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	81
7.5.2.4	Sistem Kesinliği Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar.....	82
7.5.2.5	Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	82
7.5.2.6	Doğruluk (% Geri Kazanım) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	82

7.5.2.7	Aspartam Lekelerinin Kararlı Tutulmaları ve Daha Belirgin Hale Getirilmeleri İçin Yapılan Çalışmalar	83
7.5.3	Sodyum Sakarin Analizi İçin Yapılan Çalışmalar	83
7.5.3.1	Sodyum Sakarin Lekelerinin Değerlendirilmesi Koşullarının Belirlenmesi	84
7.5.3.2	Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar ...	84
7.5.3.3	Sistem Kesinliği Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	84
7.5.3.4	Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	85
7.5.3.5	Doğruluk (% Geri Kazanım) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar	85
7.5.4	Pekmez ve Üzüm Numunelerinde Şeker (Glikoz, Fruktoz, Sakkaroz) Kompozisyonunun HPLC ile Belirlenmesi	86
7.5.5	İzotopik Fraksiyonlaşma Tespiti İçin Yapılan Analizler	87
7.5.5.1	SNIF-NMR® Analiz Yöntemi	87
	Numunelerin Şeker İçeriklerinin Tespit Edilmesi	87
	Numunelerdeki Çözünür Madde Miktarının (Briks) % 12'ye Ayarlanması ...	87
	Numunelerin Fermentasyonu	87
	Fermentasyon Kontrolü İçin Numunenin Şeker İçeriğinin Takibi Ve Fermentasyonun Sonlandırılması	88
	Numunenin Fermentasyonu Sonunda Elde Edilen Alkolün Destilasyonu	88
	Destillenen Alkolün Derişiminin Belirlenmesi	88
	Elde edilen Alkolün NMR Analizi İçin Hazırlanması	89
	NMR Spektrometresinin Standardizasyonu ve Test Edilmesi	89
	NMR Spektrumunun Değerlendirilmesi	90
	SNIF-NMR Sisteminin Numune Hazırlama Bölümünün Test Edilmesi	90
7.5.5.2	IR-MS ile Yapılan Çalışmalar	90
	IR-MS ile Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi	91
7.5.5.3	Numunelerin Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etanol Üzerinde Yapılan Çalışmalar	91
BÖLÜM 8		
	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	93
8.1	Aspartam Analizi İçin Yapılan Çalışmaların Sonuçları ve Değerlendirilmesi	93
8.1.1	Aspartam analizi için tespit edilen en uygun çalışma parametreleri	96
8.1.2	Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı	96
8.1.3	Sistem Kesinliği	98
8.1.4	Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı)	100

8.1.5	Doğruluk (% Geri Kazanım)	101
8.1.6	Aspartam Lekelerinin Belirginleştirilmesi ve Kararlı Hale Getirilmesi .	101
8.1.6.1	Çinko Nitrat Çözeltilisine Daldırılmış Plakada Sistem Kesinliği	102
8.1.6.2	Çinko Nitrat Çözeltilisine Daldırılmış Plakanın Spektrumu.....	102
8.1.6.3	Çinko Nitrat Çözeltilisine Daldırılmış Plakada Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı)	104
8.2	Sodyum Sakarin Analizi İçin Yapılan Çalışmalar	104
8.2.1	Sodyum Sakarin Analizi İçin Belirlenen Çalışma Parametreleri	105
8.2.2	Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı	106
8.2.3	Sistem Kesinliği.....	108
8.2.4	Tespit Edilebilirlik ve Tayin edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis Sınırı ve Kantitatif Tayin Sınırı)	110
8.2.5	Doğruluk (% Geri Kazanım)	110
8.3	Pekmez ve Üzüm Numunelerinde Belirlenen Şeker (Glukoz, Fruktoz, Sakkaroz) Değerleri	111
8.3.1	Pekmez Numunelerinin Sonuçları	113
8.3.2	Üzüm Numunelerinin Sonuçları	114
8.3.3	Belirlenen Şeker (Glukoz, Fruktoz, Sakkaroz) Miktarlarının Üçgen Diyagramı Yardımıyla Değerlendirilmesi.....	114
8.4	Pekmez ve Üzüm Numunelerinde İzotopik Fraksiyonlaşma Tespiti İçin Yapılan Analiz Sonuçları	116
8.4.1	NMR Spektrometresinin Standardizasyonu ve Test Edilmesi	117
8.4.2	SNIF-NMR Sisteminin Numune Hazırlama Bölümünün Test Edilmesi	118
8.4.3	IR-MS ile Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi ve Kontrolü	118
8.4.4	Numunelerin Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etanol Üzerinde Yapılan Çalışmaların Sonuçları	118
8.4.4.1	Pekmez Numunelerinin Sonuçları	118
8.4.4.2	Pekmeze İlave Edilebilecek Tatlandırıcıların Analiz Sonuçları	119
8.4.4.3	Tatlandırıcılarla Karıştırılarak Tağşiş Edilen Pekmez Numunelerinin Analiz Sonuçları	119
8.4.4.4	Üzüm Numunelerinin Sonuçları	123
8.4.5	SNIF-NMR® ve IR-MS Analiz Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	123
8.4.5.1	Aynı Bölgedeki Pekmez ve Üzüm Numunelerinin Karşılaştırılması .	126
8.4.6	Pekmez ve Üzüm Numunelerinin Yetiştigi Bölgelere Göre Kıyaslanması.....	129
8.4.6.1	Pekmez Numunelerinin Yetiştigi Bölgelere Göre Kıyaslanması.....	132

8.4.6.2 Üzüm Numunelerinin Yetiştği Bölgelere Göre Kıyaslanması	133
KAYNAKLAR	137
EK A	
BAĞ İÇİN FİLİZLENME, ÇİÇEKLENME VE OLUŞUM ZAMANLARI	141

SİMGE LİSTESİ

A	Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyon
B	Boyuna difüzyon
C	Fazlar arasındaki kütle aktarımı
H	Tabaka yüksekliği (cm)
R	Kapiler Yarıçapı
u	Çizgisel hız
ΔEm	Serbest-enerji Kazanımı
γ	Serbest Yüzey Gerilimi
V_n	Çözücünün Molar Hacmi

KISALTMA LİSTESİ

ADI	Günlük Tüketilebilir Miktar
AOAC	Association of Analytical Communities
CAC	Kodeks Alimentarius Komisyonu
CCC	Kalori Kontrol Konseyi
CDT	Canyon Diablo Troilite
DE	Dekstroz Eşdeğeri
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FID	Alev İyonlaşma Detektörü
GC	Gaz Kromatografisi
GDAB	Güneydoğu Anadolu Bölgesi
HMF	Hidroksimetilfurfural
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
IRMS	İzotop Oranı-Kütle Spektroskopisi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
JECFA	Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi
LOD	Tespit Edilebilirlik Sınırı
LOQ	Tayin Edilebilirlik Sınırı
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NHDC	Neohesperidin Dihidrokalbon
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü
OIV	International Organisation of Vine and Wine
RSD	Bağıl Standart Sapma
SCF	Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi
SD	Standart Sapma
SNIF-NMR®	Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance
TMU	Tetrametil Üre
V-PDB	Vienna- PeeDee Belemnite Standard
V-SMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Nişastayı oluşturan amiloz ve amilopektinin yapısı	5
Şekil 3.1 Tatlı tadın oluşmasını sağlayan moleküler sistem	11
Şekil 3.2 Tatlı tadın oluşumu	11
Şekil 3.3 Aspartamın molekül formülü	15
Şekil 3.4 Aspartamın sudaki çözünürlüğü-sıcaklık ilişkisi	16
Şekil 3.5 Aspartamın kimyasal yapısı ve yıkım ürünleri	16
Şekil 3.6 Sakarinin molekül formülü	18
Şekil 3.7 Asesulfam K'nın kimyasal yapısı	21
Şekil 3.8 Siklamatin molekül formülü	23
Şekil 3.9 Sakkaroz ve sukralozun molekül formülleri	24
Şekil 3.10 Neotamın molekül formülü	27
Şekil 5.1 Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi	43
Şekil 5.2 Kromatografik sistemin sınıflandırılması	44
Şekil 5.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminin şematik gösterimi	45
Şekil 5.4 Yaygın olarak kullanılan yüzeyi modifiye edilmiş silika gel plakaların şematik gösterimi	48
Şekil 5.5 Hareketli ve sabit faz seçimi için üçgen şema	49
Şekil 5.6 İnce Tabaka Kromatografisi düzeneği	49
Şekil 6.1 Su döngüsü ve bu döngü esnasında döteryumun fraksiyonlaşması	59
Şekil 6.2 Simultane izotop analizi yapılan IRMS'teki iyon kaynağı, magnet ve Faraday kafesinin genel dizilimi	64
Şekil 6.3 Toplu ve bileşik-özgü kararlı izotop analiz sistemlerinin genel görünümü	69
Şekil 6.4 Bileşik-özgü izotop analizi sistemlerinden (GC-C)-IRMS sisteminin şematik görünümü	69
Şekil 7.1 Türkiye üzüm haritası	74
Şekil 7.2 Silika jelin kimyasal yapısı	76
Şekil 7.3 CAMAG plaka ısıtıcısı ve plaka daldırma cihazı	79
Şekil 7.4 Cadiot Destilasyon Düzeneği	86
Şekil 8.1 Yürütülme yapılmaksızın aspartam uygulanan plaka yüzeyinin 190-250 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram	91
Şekil 8.2 Yürütülme yapılmaksızın aspartam uygulanan plaka yüzeyinin 250-350 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram	92
Şekil 8.3 Floresan indikatörü içeren (altta) ve içermeyen (üstte) plakaların görünümü ..	93
Şekil 8.4 Aynı şartlarda plaka zeminindeki kızarıklığın sıcaklıkla değişimi	93

Şekil 8.5	Ön denemeler sonucu elde edilen aspartam kromatogramı	95
Şekil 8.6	Aspartam uygulanan plaka yüzeyinin absorbands modunda 620 nm’de taratılması sonucu elde edilen densitogram	95
Şekil 8.7	200-1200 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü	96
Şekil 8.8	200-1000 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü	97
Şekil 8.9	Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin görünümü	97
Şekil 8.10	Ninhidrinle türevlendirilmiş aspartam lekelerinin 400-700 nm dalga boyu arası spektrumu	98
Şekil 8.11	Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin çinko nitrat ve bakır (II) nitrat çözeltilerine daldırılması sonucu görünümünün karşılaştırılması	100
Şekil 8.12	Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakadaki aspartam lekelerinin görünümü	100
Şekil 8.13	Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakanın 300-700 nm arasında elde edilen spektrum	101
Şekil 8.14	Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakada 200-1000 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü	102
Şekil 8.15	Yürütölme yapılmaksızın sakarin uygulanan plakanın yüzeyinin 190-250 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram	103
Şekil 8.16	Yürütölme yapılmaksızın sakarin uygulanan plakanın yüzeyinin 250-350 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram	104
Şekil 8.17	Ön denemeler sonucu elde edilen sodyum sakarin kromatogramı	105
Şekil 8.18	Plaka yüzeyinin adsorbans modunda 230 nm’de taratılması sonucu elde edilen densitogram	106
Şekil 8.19	200-1200 ng sodyum sakarin ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü	107
Şekil 8.20	200-1000 ng arası sakarin ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü ..	107
Şekil 8.21	Sakarin lekelerinin 200-700 nm dalga boyu arası spektrumu	108
Şekil 8.22	Standart şeker çözeltilerinin kromatogramı	110
Şekil 8.23	Fruktoz için kalibrasyon eğrisi	110
Şekil 8.24	Glukoz için kalibrasyon eğrisi	111
Şekil 8.25	Sakkaroz için kalibrasyon eğrisi	111
Şekil 8.26	Üçgen diyagramında fruktoz/glukoz oranı 0,9-1,1 aralığında ve sakkaroz miktarının en fazla % 1,5 olduğu alan	113
Şekil 8.27	Pekmez analiz sonuçlarının ve sakkaroz ilavesiyle kirletilen numuneden elde edilen verilerin üçgen diyagramında yerleşimi	114
Şekil 8.28	Üzüm analiz sonuçlarının üçgen diyagramında yerleşimi	115
Şekil 8.29	Doğal etanolün tipik bir ^2H -NMR spektrumu; standart numuneye ait I, II, III ve IV numaralı sinyallerin ilgili oldukları moleküller sırasıyla şöyledir: $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$, CH_3CHDOH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$, ve Tetrametilüre (TMU).	115
Şekil 8.30	Numunelerin fermantasyonu sonucu elde edilen etanolde tespit edilen $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin $(\text{D}/\text{H})_I$ değerleri ile normalize edilmesi.	122
Şekil 8.31	Numunelerin fermantasyonu sonucu elde edilen etanolde tespit edilen $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin $(\text{D}/\text{H})_I$ değerleri ile normalize edilmesi sonucu elde edilen taşıyıcı üçgeni	123
Şekil 8.32	Doğası gereği düşük döteryum içeriğine sahip 1 ve 3 nolu üzüm ve 1 nolu pekmez örneklerinin REF bölgesi içerisine dahil edildiğinde elde edilen taşıyıcı üçgeni	124
Şekil 8.33	Aynı bölgede yetiştirilen üzüm ve pekmez numunelerinin $(\text{D}/\text{H})_I$, $(\text{D}/\text{H})_{II}$ ve $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin karşılaştırılması.	127

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1	2004-2010 yılları arasındaki üretilen üzümün kullanım alanları ve % dağılımları	2
Çizelge 3.1	Besin değeri olan tatlandırıcılar	13
Çizelge 3.2	Besin değeri olmayan tatlandırıcılar	13
Çizelge 3.3	Doğal ve yapay tatlandırıcıların sakkarozaya göre kütlece tatlılık derecesi....	14
Çizelge 4.1	Üzüm salkımının çeşitli kısımlarının % bileşimi	30
Çizelge 4.2	Üzümün yenilebilen kısımlarının kimyasal bileşimi	30
Çizelge 4.3	Üzüm ve üzüm suyunun bileşimi ve özellikleri.....	31
Çizelge 6.1	Birtakım kararlı izotoplar, doğal bollukları ve referans maddeleri.....	54
Çizelge 6.2	Serbest su yüzeyinde buharlaşma miktarının enlemlere göre değişimi	57
Çizelge 7.1	Kullanılan kimyasallar, sarf maddeler ve temin edildikleri firma bilgileri .	72
Çizelge 7.2	Aspartam ve sodyum sakarin ilave edilerek yapılan çalışmada kullanılan gıda ürünleri ve özellikleri	73
Çizelge 7.3	İncelenen pekmez numuneleri ve bölgeleri	74
Çizelge 7.4	İncelenen üzüm suyu, kuru üzüm numuneleri ve yetiştirildikleri bölgeler .	74
Çizelge 7.5	Pekmeze ilave edilebileceği düşünülen tatlandırıcılar ve özellikleri	75
Çizelge 7.6	Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi Amacıyla Uygulanan Metot ve Çalışma Parametreleri	84
Çizelge 7.7	NMR tüpünü eklenen madde ve miktarları.....	87
Çizelge 7.8	NMR Spektrometresinin test edildiği standart etanol çözeltileri ve değerleri	87
Çizelge 7.9	IRMS'e bağlı GC'nin çalışma parametreleri	89
Çizelge 8.1	Aspartam konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri.....	95
Çizelge 8.2	Aspartam miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri	96
Çizelge 8.3	10 adet 500 ng aspartam uygulaması sonucu tespit edilen sonuçlar.....	97
Çizelge 8.4	200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiğin 500-620 nm dalga boyu aralığındaki korelasyon katsayısı değerleri	98
Çizelge 8.5	Aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler	98
Çizelge 8.6	Farklı matriks türlerinde aspartamın % geri kazanımı.....	99
Çizelge 8.7	200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiğin korelasyon katsayısı değerinin değişimi	101
Çizelge 8.8	10 adet 500 ng aspartam uygulanması yapılan ve çinko nitrat çözeltisine	

	daldırılan çalışmada tespit edilen miktar ve % geri kazanım değerleri	101
Çizelge 8.9	Çinko nitrat çözeltine daldırılan plakadaki aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler	102
Çizelge 8.10	Ninhidrinle türevlendirilerek 620 nm’de taratılma sonucu ile aynı plakanın ninhidrinle türevlendirme sonrası çinko nitrat çözeltine daldırılması ve 400 nm’de yapılan taratılma sonuçlarının karşılaştırılması	102
Çizelge 8.11	Sakarin konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri	104
Çizelge 8.12	Sakarin miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri.....	106
Çizelge 8.13	10 adet 500 ng sakarin uygulanması sonucu elde edilen % miktar değerleri	107
Çizelge 8.14	Sakarin için tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler	108
Çizelge 8.15	Farklı matriks türlerinde sakarinin % geri kazanımı.....	109
Çizelge 8.16	Pekmez örneklerinde belirlenen glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri.....	111
Çizelge 8.17	Üzüm örneklerinde belirlenen glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri.....	112
Çizelge 8.18	Sakarin Test materyallerinin değerleri ve NMR’da tespit edilen değerler	115
Çizelge 8.19	Susuz etanol ve aynı numunenin % 10’luk sulu çözeltisini destillenmesi sonucu tespit edilen (D/H) _I değerinin karşılaştırılması	116
Çizelge 8.20	Pekmez örneklerinden elde edilen etanolde tespit edilen (D/H) _I , (D/H) _{II} , R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri.....	117
Çizelge 8.21	Pekmeze ilave edilebileceği düşünülen tatlandırıcılardan elde edilen etanolde tespit edilen (D/H) _I , (D/H) _{II} , R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri.....	117
Çizelge 8.22	1 ve 4 nolu pekmezlerin % 50 oranında tatlandırıcılarla karıştırılması sonucu elde edilen etanolde tespit edilen (D/H) _I , (D/H) _{II} , R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	118
Çizelge 8.23	Bazı bitki türlerine ait (D/H) _I ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri.....	120
Çizelge 8.24	Üzüm örneklerinden elde edilen etanolde tespit edilen (D/H) _I , (D/H) _{II} , R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri	121
Çizelge 8.25	Çizelge 7.3 ve Çizelge 7.4’de belirtilen aynı bölgeye ait üzüm ve pekmez numunelerinden elde edilen etanolde tespit edilen (D/H) _I , (D/H) _{II} , R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri.....	125
Çizelge 8.26	İncelenen pekmez ve üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgedeki bağların filizlenme, çiçeklenme ve oluşum tarihleri	128
Çizelge 8.27	Pekmez ve üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgelerin birtakım iklimsel ve coğrafi verileri	129
Çizelge 8.28	İncelenen pekmez örneklerinin yetiştirildiği bölgeye göre iklimsel bölgeleri ve bu bölgelerin tespit edilen (D/H) _{II} ve (D/H) _I değerleri	130
Çizelge 8.29	İncelenen üzüm suyu ve kuru üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgeye göre iklimsel bölgeleri ve bu bölgelerin tespit edilen (D/H) _{II} ve (D/H) _I değerleri	132

GIDA ÜRÜNLERİNDE ŞEKER YERİNE KULLANILAN DOĞAL VE SENTETİK MADDELERİN ANALİZİ İÇİN YENİ YÖNTEM GELİŞTİRMEK

Muharrem YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR

Dünya gıda pazarındaki rekabetin artışı, yerli tüketicilerin yüksek kaliteli ürünleri düşük fiyatlara alma beklentisi gıda kalitesinin izlenmesi için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır.

Gıdalarda yapılan tatlandırıcı ve hilenin veya yanıltıcı ilavelerin tespiti için gerek mevcut analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekse de hem Avrupa Birliği hem de diğer gelişmiş ülkelerde yasal düzenlemelerin yapılması adına yönetmelikler ve tüzükler sürekli güncellenmektedir. Ancak, yapılan bilimsel araştırma ve çalışmalara paralel olarak gıda sahtecileri de kabul edilen bu analitik yöntemleri bertaraf edebilecek teknikler geliştirmektedirler.

Çalışmamızın ilk bölümünde, sentetik tatlandırıcılardan en yaygın olarak kullanılanlardan aspartam ve sakarinin Enstrümantal Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisiyle (YPİTK) nitel ve nicel analizi incelenmiştir.

Aspartam, HPTLC Silika Jel 60 plaka üzerinde yürütülmüş sonrasında ninhidrin çözeltisi ile türevlendirilerek 620 nm’de taratılmıştır. Bu şartlar altında aspartam kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng arasında doğrusal olup korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,9955’dir. 500 ng aspartam uygulamasının 10 tekrarı sonucu % kazanım 95,7-107,4 arasında tespit edilmiştir. Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 111,31 ve 36,73 ng’dir. Şekerli şurup, unlu mamul, bebek maması ve şekerli çikolata gibi farklı matriks türlerinde aspartamın % geri kazanımı 95,0-96,6 arasında tespit edilmiştir. Sonrasında plakanın çinko nitrat çözeltisine daldırılmasıyla kararlı ve belirgin aspartam lekeleri

elde edilmiş ve % geri kazanım 96,5-103,0 arasında, tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 16,44 ve 5,42 ng olarak bulunmuştur.

Sodyum sakarin, HPTLC Silika Jel 60 F₂₅₄ plaka üzerinde yürütülerek 230 nm’de taratıldığında kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng arasında doğrusal olup korelasyon katsayısı (R²) değeri 0,9974 olarak tespit edilmiştir. 500 ng aspartam uygulamasının 10 tekrarı sonucu % kazanım 96,5-102,7 arasında bulunmuştur. Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 26,68 ve 8,81 ng’dır. Şekerli şurup, unlu mamul, bebek maması ve şekerli çikolata gibi farklı matriks türlerindeki % geri kazanımı 99,1-107,7 arasında tespit edilmiştir. Ayrıca incelenen matriks türlerinde uygulanan metotların spesifik olduğu da gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise gıda ürünlerine ekonomik değeri düşük tatlandırıcıların ilave edilmesi suretiyle yapılan hilenin ve elde edilen veriler ışığında ürünün coğrafik kökeni ve orijinalliğinin tespit edilebilmesine çalışılmıştır.

Çalışmada incelenen pekmez ve üzüm örneklerinin fruktoz, glukoz ve sakkaroz miktarları HPLC ile tespit edilerek üçgen diyagramında yerleştirilmiş ve Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi tebliğinde belirtilen aralıklar baz alınarak elde edilen işaretlenmiş bölge içinde olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Eğer pekmez analizi ile bulunan sonuçlar bu bölge içinde değil ise o pekmezin hileli olma olasılığı oldukça yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Ancak pekmeze eşit miktarlarda fruktoz ve glikoz ilavesi veya invert şeker ilavesi yapılarak fruktoz/glikoz oranı doğal şıradaki gibi 0,9-1,1 arasında ayarlandı ise, bu ilaveyi kromatografik olarak tespit etmek mümkün değildir. Bu aşamada kararlı izotop analizleri önem kazanmakta ve bu analizler sonucu elde edilen verilerin kullanımıyla oluşturulan tağşiş üçgeninin kullanılmasıyla pekmezde yapılan tağşiş ve bu tağşişin hangi suretle yapıldığı tespit edilebilmektedir.

Aynı bölgede yetişen pekmez ve üzüm numunelerinin SNIF-NMR sonucu elde edilen (D/H)_I ve (D/H)_{II} sonuçlarının büyük oranda örtüştüğü ve aynı zamanda bu değerlerin meteorolojik verilerle oluşturulan bölgelerle de uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, ilk olarak tarafımızca yapılan bu çalışmada pekmez ve üzüm örnekleri bölgesel olarak farklılaştırılmışlardır.

Anahtar Kelimeler: Aspartam, sakarin, YPİTK, çinko nitrat, HPLC, tağşiş, hile, pekmez, etanol, kararlı izotop analizi, döteryum, SNIF-NMR®, karbon izotopu, IRMS, orijinallik, coğrafik köken.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NEW METHODS FOR THE ANALYSIS OF NATURAL AND SYNTHETIC COMPOUNDS USED AS SUGAR SUBSTITUTES IN FOODS

Muharrem YILMAZ

Department of Analytical Chemistry

PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR

Increasing competition in the world food market and domestic consumers' expectation of high-quality products at a low price means there is a need for new tools for monitoring food quality.

Both the development of analytical methods and regulations as well as European Union and other developed countries on behalf of legal arrangements are updated continuously. However, it must be stated that, despite this ongoing research, those involved in carrying out food fraud are also continuing to develop new ways of circumventing accepted techniques for food authentication.

In the first part this thesis, the qualitative and quantitative analyses of aspartame and saccharin being common synthetic sweeteners have been investigated with Instrumental High Performance Thin-Layer Chromatography.

Aspartame developed on HPTLC Silica Gel 60 plates, then quantified at 620 nm after derivitization with ninhydrine solution. The aspartam calibration plot was linear between 200 and 1200 ng/spot with a coefficient of determination (R^2) of 0.9955. When 10 repetition of 500 ng/spot aspartam processed, results were found between 95.7-107.4 %. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 36.73 and 111.31 ng/spot, respectively. % Recovery was found between 95.0 and 96.6 with different types of matrix such as sugar syrup, cereals, infant food and chocolate with sugar. Then the plate immersed to zinc nitrate solution to get stable and marked

aspartame spot. % Recovery was determined between 96.5 and 103.0, and LOD and LOQ were 5.42 and 16.44 ng/spot, respectively at this condition.

Sodium saccharin developed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plates, then quantified at 230 nm. The saccharin calibration plot was linear between 200 and 1200 ng/spot with a coefficient of determination (R^2) of 0.9974. When 10 repetition of 500 ng/spot aspartam processed, results were found between 96.5-102.7 %. LOD and LOQ were 8.81 and 26.68 ng/spot, respectively. % Recovery was found between 99.1 and 107.7 with different types of matrix such as sugar syrup, cereals, infant food and chocolate with sugar. However, it is observed that these methods have been specific matrix studied.

In the second part of the thesis, the determination of adulteration with the addition of low cost sweeteners to foods has been studied. Moreover, the authenticity and geographical origin of samples has been tried to determine.

Amounts of fructose, glucose, and sucrose in grape molasses determined with HPLC have been replaced in a triangle diagram, and it has been checked whether they have been placed shaded area created on behalf of Turkish Food Codex Grape Syrup Regulation or not. It has been concluded that if results have been placed out of shaded area, the grape molasses is a very high probability of being fraudulent.

Nevertheless if grape molasses have been adulterated with addition of equal amounts of fructose and glucose or inverted sugar to arrange fructose/glucose ratio around 0.9-1.1 as natural grape concentrate, it is impossible to determine using chromatographic methods this type of adulteration. Stable isotopic analyses have been gained importance at this stage. The adulterated triangle has been created by using obtained data, and this graph provides information about whether molasses is adulterated or not even the type of sweetener in molasses evaluated as fraudulent.

(D/H)_I and (D/H)_{II} results obtained from SNIF-NMR have been largely coincided with grape and grape molasses samples grown in the same region, and it is observed that these values have been compatible with region generated by us using meteorological data. Besides, grape molasses and grape samples have been differentiated regionally with this study done by us firstly.

Key words: Aspartame, saccharin, HPTLC, zinc nitrate, HPLC, adulteration, fraud, grape molasses, ethanol, analysis of stable isotopes, deuterium, SNIF-NMR®, carbon isotope, IRMS, authenticity, geographical origin.

1.1 Literatür Özeti

Dünya gıda pazarındaki rekabetin artışı, yerli tüketicilerin yüksek kaliteli ürünleri düşük fiyatlara alma beklentisi gıda kalitesinin izlenmesi için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır.

Gıdalarda yapılan tağşiş ve hilenin veya yanıltıcı ilavelerin tespiti için gerek mevcut analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekse de hem Avrupa Birliği hem de diğer gelişmiş ülkelerce yasal düzenlemelerin yapılması adına yönetmelikler ve tüzükler sürekli güncellenmektedir. Ancak, yapılan bilimsel araştırma ve çalışmalara paralel olarak gıda sahtecileri de kabul edilen bu analitik yöntemleri bertaraf edebilecek teknikler geliştirmektedirler. Örneğin 2008’de Çin’de görülen melamin katkılı süt ürünleri gibi.

Gıda katkı maddeleri, gıdaların renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özelliklerini düzenlemek, besleyici değerlerini korumak, dayanıklılıklarını arttırmak ve birtakım teknolojik işlemlere yardımcı olmak gibi amaçlarla ilave edilirler. Avrupa Birliğinin, 89/107/EEC nolu Avrupa Parlamentosu ve Konsey direktifinde; sadece teknik olarak kullanılmasına ihtiyaç duyulan katkı maddelerinin gıdaların üretiminde veya hazırlanmasında kullanılabileceği, bunların tüketiciyi aldatmaya yönelik olmaması ve tüketicinin sağlığına zarar vermemesinin gerektiği belirtilmiştir.

Şeker içeren ürünlerin aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, şişmanlık, şeker hastalığı, hipertansiyon, ağız-diş sağlığı ve kalp-damar hastalıklarındaki hızlı artış gibi sebeplerden dolayı, katkı maddelerinin arasında **tatlandırıcılar** yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisinde giderek artış gösteren yaygın bir kullanım alanına sahiptirler.

94/35 ve 94/31 nolu Avrupa Parlamentosu ve Konsey direktifleri ve 2006/45 ve 2001/46 nolu Türk Gıda Kodeksi tebliğleri gıda maddelerini tatlandırmak amacıyla kullanılan tatlandırıcılarla ilgilidir. Bu direktif ve tebliğlerde satışa sunulan gıdaları veya gıda üretiminde hangi tatlandırıcıların ve ne ölçüde kullanılabileceği, Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) olumlu görüşü de alınarak, belirtilmektedir.

Aspartam gıdalarda sıvı kromatografisi (HPLC) [1], IR Spektroskopisi [2], Kapiler Elektroforez [3] ile; sakarin ise gıda ve ilaçlarda potansiyometre [4], IR Spektroskopisi [5], Gaz Kromatografisi (GC) [6], HPLC [1] ve iyon kromatografisiyle [7] analiz edilmektedir. İTK genellikle bu tür tatlandırıcıların kalitatif analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç ve bazı gıdalarda aspartam ve sakarinin farklı matris türlerinde İTK ile tespitine yönelik çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır [8, 9, 10].

Gıda Sektöründe çok yaygın olarak görülen bir hile şeklide, numuneye beyan edilmeden yapılan tatlandırıcı ilavesidir. Özellikle karbohidratça zengin gıdalarda bu yolla yapılan tağşişin tespiti oldukça güçtür, çünkü ilave edilen tatlandırıcılar ürünün mevcut karbohidrat profili ile uyum içindedir. Tatlandırıcıların analizi, ürünün orijinalliğinin ve yapılan hilenin tespiti için bir belirteç olabilmektedir.

2010 yılı verilerine göre 4 255 000 ton üzüm üretimiyle Türkiye, Dünya’da İtalya, ABD, Çin, İspanya ve Fransa’dan sonra 6., Avrupa’da ise 4.sırada yer almaktadır. 2010’da ülkemizde üretilen üzümün % 52,8’i sofralık, % 36,3’ü kurutmalık, % 10,8’i ise şaraplık olarak kullanılmıştır. 2004-2010 yılları arasındaki üretilen üzümün kullanım alanları ve % dağılımları Çizelge 1.1’de yer almaktadır [11].

Çizelge 1.1 2004-2010 yılları arasındaki üretilen üzümün kullanım alanları ve % dağılımları

Üretilen Yıl	Üretilen Üzümün Kullanıldığı Yerler ve % Dağılımı		
	Sofralık	Kurutmalık	Şaraplık
2004	54.3	35.1	10.6
2005	51.9	36.4	11.7
2006	51.5	37.4	11.1
2007	52.9	33.7	13.3
2008	50.3	37.7	12.0
2009	52.9	35.9	11.2
2010	52.9	36.3	10.8

Pekmez geleneksel bir Türk gıdası ve bizim için önemli bir besin maddesidir. Son zamanlarda hileli pekmez örnekleri hem iç piyasada hem de ihracatta Türkiye için

artarak büyüyen bir problem teşkil etmektedir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği 2007/27 nolu üzüm pekmezi tebliğine göre sıvı üzüm pekmezi sadece kendi meyvesinde elde edilen şıra ile üretilmeli ve ilave tatlandırıcı içermemelidir. Ancak maliyeti düşürmek adına glikoz şurubu, yüksek fruktozlu mısır şurubu ve sakkaroz gibi tatlandırıcılar üzüm şirasına ilave edilerek karıştırılmakta ve hatta sadece invert şeker şurubu ve renklendirici karamel kullanılarak pekmeze benzer ürünler sunulmaktadır.

Literatürde, pekmezde yapılan tağşişin tespit edilebilmesi amacıyla ticari olarak üretilen bazı sıvı ve katı üzüm pekmez örneklerinin fiziksel özellikleri ile kimyasal bileşenleri belirlenerek Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi Tebliği' ne uygunluğu incelenmiş [12], farklı oranlarda glikoz ve fruktoz şurupları doğal pekmezle karıştırılarak numunelerin şeker ve mineral içerikleri regrasyon analiz metodu kullanılarak araştırılmış [13], üzüm pekmezi farklı meyve konsantreleri ile karıştırılarak birtakım fiziksel ve kimyasal özellikleri ve bileşimleri karşılaştırılmıştır [14]. Kararlı izotop analizi ise sadece bir çalışmada üzüm pekmezi örneklerinin IRMS kullanılarak toplu-izotop analizi yönünden incelenmiştir [15].

1.2 Tezin Amacı

Tatlandırıcıların, insan sağlığı üzerine süre gelen tartışmaları, mevcut tebliğ ve direktiflere uygunluğunun ve T.C. Başbakanlık Gümrük Müsteşarlığı bünyesine gelen numunelerin kontrolü göz önüne alındığında; geniş bir gıda matriksine uygulanabilirliği olan, kısa analiz süresine sahip, ekonomik, analiz ön hazırlığını en az düzeye indirebilen, aynı anda birden fazla numunenin analizine farklı tanı prensiplerinin uygulanabilirliğine izin veren bir yöntem ihtiyacı duyulduğundan sentetik tatlandırıcılardan aspartam ve sakarinin YPİTK'de nitel ve özellikle nicel analizleri incelenmiştir.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise gıda ürünlerine ekonomik değeri düşük tatlandırıcıların ilave edilmesi suretiyle yapılan hilenin ve elde edilen veriler ışığında ürünün coğrafi kökeninin tespit edilebilmesine çalışılmıştır.

Ülkemizce bolca üretilen üzüm ve bu üzümden elde edilen ürünlerin kontrolü önem arz etmektedir. Bölgesel olarak seçilen pekmez örnekleri ve bu pekmezlerden bazılarının üretildikleri üzüm suyu ve kuru üzüm numuneleri, hem pekmezde yapılan hile ve tağşişin tespiti hem de coğrafi köken bakımından farklılaştırılabilmesi amacıyla, öncelikle sıvı kromatografik yöntemle mono ve disakkarit dağılımları tespit edilerek

kıyaslanmıştır. Sonrasında, bilindiği kadarıyla Türkiye topraklarında yetişen üzümde elde edilen ürünlerin kararlı izotop analizleri SNIF-NMR® ve IRMS yöntemleriyle ilk defa bu çalışmamızda incelenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen pekmez ve üzüm örneklerine ait veriler hem kendi aralarında hem de birbirleriyle kıyaslanmıştır. SNIF-NMR® ve IRMS yöntemleriyle elde edilen veriler kullanılarak tağşiş üçgeni oluşturulmuş ve bu grafikte pekmezin tağşişli olup olmadığı, hatta tağşişli ise ne tür bir tatlandırıcı ilave edildiği hakkında bilgi edinilmektedir. Ayrıca numuneler, elde edilen kararlı izotop analiz sonuçlarının numunelerin yetiştirildiği bölgelere ait meteorolojik verilerle de ilişkilendirilerek bölgesel olarak farkedilmeye çalışılmıştır.

1.3 Bulgular

Çalışmamızın ilk kısmında yüksek yoğunluklu yapay tatlandırıcılardan aspartam ve sakarinin enstrümantal Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisiyle (YPİTK) nitel ve nicel analizi incelenmiş, farklı matriks türlerinin bulunduğu ortamda ve bu şartlarda metotların spesifik olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu metotlar gıda sanayi için, özellikle iş yoğunluğu yüksek laboratuvarlarda kısa süreli ve güvenilir olup rutin analizlerde diğer yöntemlere göre (HPLC gibi) düşük-maliyetli alternatif yöntemler olarak sunulmuştur.

İkinci bölümünde yer alan çalışma, ülkemiz topraklarında yetiştirilen üzüm ve üzümde elde edilen ürünlerle ilgili olarak örneklerin fermente edilmesiyle elde edilen alkolle SNIF-NMR® ve IR-MS yöntemlerinin kullanılmasıyla yapılan ilk izotopik çalışmadır.

Ayrıca, ilk olarak yapılan bu çalışmada SNIF-NMR® ve IRMS verilerinin birlikte kullanılmasıyla **Tağşiş üçgeni** adı verilen grafik elde edilmiş ve bu grafik sayesinde üzüm ve pekmez örneklerinin orijinal veya hileli olup olmadığı hatta hileli ise ne tür bir katkı ile hile yapıldığı hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda saf pekmez örneklerinin hem SNIF-NMR® hem de IRMS sonuçları kirletilen örneklerinkinden belirgin derece farklı oldukları gözlemlenmiştir.

Aynı bölgede yetişen pekmez ve üzüm numunelerinin SNIF-NMR sonucu elde edilen (D/H)_I ve (D/H)_{II} sonuçlarının büyük oranda örtüştüğü ve aynı zamanda bu değerlerin meteorolojik verilerle oluşturulan bölgelerle de uyumlu olduğu görülmüştür. İlk olarak tarafımızca yapılan bu çalışmada pekmez ve üzüm örnekleri bölgesel olarak farkedilmişlerdir.

KARBOHİDRATLAR

Karbohidratlar biyosferde en bol bulunan organik moleküllerdir ve monosakkaritler, oligosakkaritler, polisakkaritler şeklinde isimlendirilen geniş bir grubu oluştururlar. Basit, polimerik ve kompleks formlarda olabilirler. Karbohidratların tüm formlarının polaritesi yüksektir ve suda çok çözünürler.

Karbohidratlar birçok farklı alanda kullanıldıkları için analitik tayinleri önem kazanmaktadır; özellikle biyolojide enerji veren moleküllerdir ve gıdalardaki genel katkı maddeleridir. İnsan sağlığında, kardiyovasküler hastalıklardan, diyabette ve diş çürüklerine kadar geniş bir alanda önemlidirler. Fermantasyon teknolojisinde şeker ya da şeker karışımları olarak anılan karbohidratlar mikrobiyal hücreler için karbon kaynağı olarak kullanıldığından dolayı biyoprosesin izlenmesi açısından tayinleri önem kazanmaktadır. Glikoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz, laktoz ve şeker alkoller gibi karbohidratlar yiyecek ve endüstrisinde önemlidir. Glukoz diyabet hastalığının izlenmesinde ve tedavisinde önemli olan bir moleküldür [16].

Karbohidrat, hem canlının yapısına katılan hem de enerji sağlayan karbon, hidrojen ve oksijen elementlerinden oluşan organik bileşiklerin genel adıdır.

Karbohidratlar aktif aldehit veya keton grubuna sahip polialkoller veya hidroliz edildiklerinde bu maddeleri veren bileşikler olarak tanımlanabilir.

Bütün canlı hücrelerde bulunur. Doğada genellikle büyük moleküller halindedir. Vücuda alınan bu büyük moleküllerin hücrelere iletilmesi için canlı tarafından sindirilmesi ve uygun molekül büyüklüğüne kadar parçalanması gerekir.

Karbohidratlar birinci dereceden enerji verici olarak kullanılırlar. Karbohidratlar en çok ekmek, makarna, fasulye, patates, kepek, pirinç, tahıl ve hububat içinde bulunurlar.

Karbohidratlar vücutta en çok bulunan üçüncü besin maddesidir. Açlık anında ilk tüketilen besin maddesidir. Yapıtaşları glikozdur. Depo şekli glikojendir.

Karbohidrat bulunan besinlerin sindirimi ağızda başlar. Ağızdaki tükürük bezlerinin salgıladığı Pityalin(Amilaz) enzimi sayesinde kimyasal sindirim başlar. Aynı zamanda ağızda dişlerimiz sayesinde mekanik sindirim de başlamış olur. Vücudumuzda karbohidratların kimyasal sindirimi ince bağırsakta pankreas tarafından salgılanan pankreas öz suyu sayesinde biter. Sindirim ağızda başlayarak kalın bağırsakta son bulur.

2.1 Monosakkaritler

En basit karbohidratlardır, daha küçük parçalarına ayrılamazlar ve basit şekerler olarak adlandırılır. En küçük olan ve hücreden en rahat geçen-karbohidrattır. Monosakkaritler, su ile daha küçük birimlere parçalanamadıklarından basit şekerler, tek şekerler, monozlar olarak da bilinirler. Çoğu $C_n(H_2O)_n$ formülüne uyar. Zincir veya halkalı yapıya sahip olup, genellikle 3-6 arasında karbon atomu taşırlar. Moleküllerindeki karbon sayılarının Latincelerinin sonuna -oz eki getirilerek gruplandırılırlar. Üç karbonlu olanlar trioz, dört karbonlular tetroz, beş karbonlular pentoz, altı karbonlular heksoz adını alırlar. Pentozlardan riboz ($C_5H_{10}O_5$) ve deoksiriboz ($C_5H_{10}O_4$) nükleik asitlerin yapısına girer. Hücre zarından difüzyon ile kolay geçerler. Besin kaynağı bakımından önemli olan monosakkaritler heksozlardır. Bunlardan glikoz, fruktoz (levüloz) ve galaktoz en önemlileridir. Sindirilmeden kana karışırlar. Hepsinin kapalı formülleri $C_6H_{12}O_6$ şeklinde olup birbirlerinin izomeridirler.

Monosakkaritlerin, karbon sayısı 3-8 arasında değişir. Biyolojik açıdan önemli monosakkaritler; 5 karbonlu pentoz ve 6 karbonlu heksoz şekerlerdir. Riboz ve deoksiriboz, 5 karbonlu şekerlerdir. Glikoz (üzüm şekeri, kan şekeri), galaktoz ise 6 karbonlu şekerlerdir. Suda çözünürler ve tatlıdırlar. Fruktoz (meyve şekeri) bitkilerde bulunur ve insanlarla hayvanlar da bitkileri yediği için onlara da geçer.

2.2 Disakkaritler

Disakkaritler çift şekerlerdir. Bir disakkarit iki molekül monosakkaritin glikozit bağı ile bağlanmasıyla oluşur. Bu bağlanma sırasında bir molekül su ortaya çıkar. Buna dehidrasyon sentezi denir. İnsan ve hayvanların yedikleri disakkaritler, sindirim sisteminde monosakkaritlerine ayrılarak kullanılır. Canlılarda en çok bulunan

disakkaritler; maltoz (arpa şekeri), sakkaroz diğer adı sükroz (çay şekeri), laktoz (süt şekeri)dir.

Disakkariti oluşturan monosakkaritler aynı cinsten olabileceği gibi, farklı cinsten de olabilirler. Aşağıda birtakım disakkaritlerin meydana gelişleri gösterilmektedir:



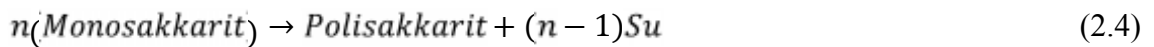
2.3 Oligosakkaritler

Üç ile altı arasında monosakkaritin birleşerek dehidrasyonu (su açığa çıkması) ile meydana gelirler. Bazı bitkilerde serbest olarak bulundukları gibi, karbohidrat olmayan çeşitli maddelerin yapısına da katılırlar. Üç monosakkaritten ibaret olanlara **trisakkarit**, dörtlü olanlara **tetrasakkarit** denir.

Raffinoz, heksozlardan türeyen önemli bir trisakkarittir. Fruktoz, glikoz ve sakkaroz moleküllerinden meydana gelmiştir. Şeker kamışında, okaliptüs türü ağaçlarda, pamuk tohumunda bulunur. Şeker üretimi esnasında melasta toplanır. Enerji vermenin yanı sıra yapı maddesi olarak da kullanılırlar.

2.4 Polisakkaritler

Çok sayıda monosakkaritin dehidrasyonu ile oluşmuş büyük moleküllü karbohidratlardır. Temel yapı birimi glikoz molekülüdür. Kolloid yapıda olan bir bileşiktir. Bitkilerde, ozmotik basıncı yükselteceğinden dolayı şekerler monosakkarit halde depolanamaz, bu nedenle polisakkaritlere çevrilerek saklanırlar.



Bazı önemli polisakkaritler şunlardır:

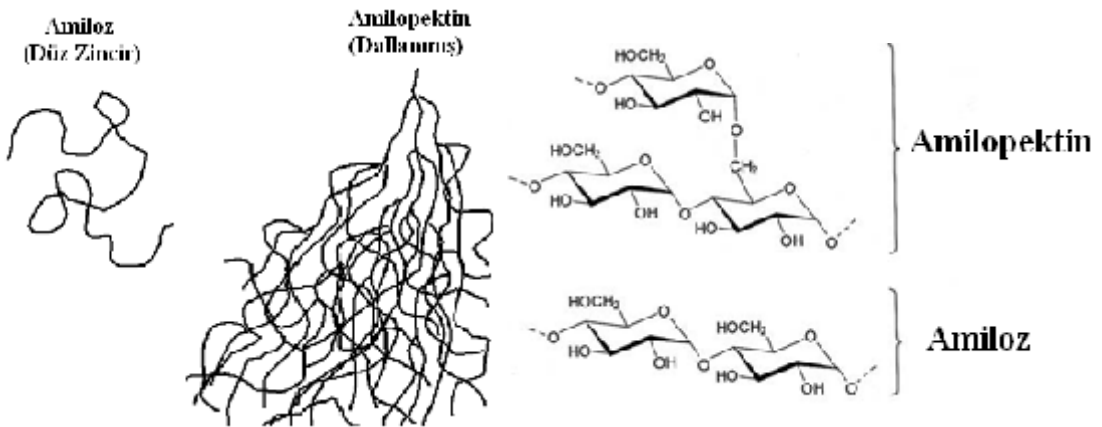
- Nişasta: En önemli bitkisel polisakkarittir. İyotla maviye boyanır ve monosakkaritlere parçalanmadan indirgenemez.
- Selüloz: Binlerce glikoz molekülünden oluşmuş, suda erimeyen iyotla boyanmayan bir bitkisel polisakkarittir. Hayvanlarda tulumlular hariç bulunmazlar.

- Glikojen: Hayvanlarda bulunan polisakkarittir. Özellikle karaciğer ve kasta bu şekilde yedek enerji kaynağı olarak depo edilir.
- Neuramin Asit: Sütteki oligosakkaritlerde bulunur ve membran oluşturan glikolipitte bulunur.
- Uron Asidi ve Glikuron Asidi de diğer polisakkarit gruplarındandır.

2.4.1 Nişasta

Nişasta, farin veya amidon, suda çözünmeyen, kompleks bir karbohidrattır. Bitkiler tarafından fazla glikozu depolamak için kullanılır. Gıda sanayisinde kıvamlandırıcı, yemek yapımında sıvıları koyulaştırmakta kullanılır. Çoğunlukla tahıllardan ve patatesten elde edilen tatsız ve kokusuz bir tozdur. Hayvanlarda ise besinlerle alınan nişasta sindirim sisteminde hidrolize uğrayarak glikoz birimlerine ayrılıp kana geçebilecek duruma gelir.

Kimyasal olarak nişasta, amiloz ve amilopektin isimli iki polimerik karbohidratın birleşimidir. Amiloz, glikoz monomer birimlerinin alfa-1,4 bağlantılılarla ucuca eklenmesinden oluşur. Amilozdan farklı olarak amilopektinde dallanma vardır, ana her 24-30 glikoz monomerinden birinde alfa-1,6 bağlantısı ile bir yan zincir başlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Nişastayı oluşturan amiloz ve amilopektinin yapısı

Amiloz lineer bir moleküldür, ancak birbirini izleyen glikoz birimlerinin açılı olma eğiliminden dolayı bir sarmal oluşturur. İki amiloz molekülü birbirine sarılarak bir çift sarmal da oluşturabilirler. Bu sarmalın iç yüzeyi hidrofobik olduğu için içinde yer alan su molekülleri kolaylıkla daha hidrofobik moleküllerle yer değiştirebilir. Nişasta testinde kullanılan iyot molekülleri amiloz sarmallarının içine dizilince mavi bir renk

oluşur. Amiloz sarmalları arasında oluşan hidrojen bağları yüzünden içinde çok az su barındıran yoğun bir yapı oluşur.

Amilopektinde dallanma noktalarından sonra birbirine paralel iki zincir birbirlerine sarılarak bir çift sarmal oluştururlar. Amilopektin, bir çalı gibi, bir merkezden dallandıkça genişleyen bir şekle sahiptir. Dallanmakta noktalarında molekül düzensizdir, iki dallanma noktası arasında ise çift sarmallar düzgün bir şekilde istiflenerek kristal bir yapı oluştururlar; bu yüzden mikroskopta nişasta taneciklerinde bu düzenli ve düzensiz bölgeler büyüme halkaları gibi görünür.

Bu moleküler yapısından dolayı amilopektin, nişasta taneleri olarak depolanmasını sağlayan sarmal şekilli olur. Hem amilopektin hem de amiloz glikozun polimerleridir ve tipik bir amiloz polimeri 500-20.000 glikoz molekülünden, bir amilopektin molekülü ise yaklaşık bir milyon glikozda oluşur.

Yapısal olarak nişasta, birbirine bağlı, lineer polimer sütunlardan oluşur. Amilopektinde alfa-1,4 bağlantılı zincirler, düzenli aralıklarla alfa-1,6 bağlantılarıyla dallanır. Farklı bitki türlerinde, hatta aynı türün farklı anaçlarında (*cultivar*) amilozun amilopektine oranı değişir. Bitkilerde nişastanın başlıca işlevi enerji depolamaktır. Bitki hücrelerinde nişastanın oluşumu amiloplast denen organellerde gerçekleşir.

Nişasta suda çözünmez. Sindirilmesi hidroliz yoluyla olur, bu reaksiyonu katalizleyen amilaz enzimleri glikozlar arasındaki bağları keserler. Hayvan ve insanlar amilaz enzimlerine sahip olduklarından nişastayı sindirebilirler. Farklı tip amilazlar nişastayı farklı biçimlerde parçalarlar. Nişasta parçalandıkça dekstrin, maltoz ve nihayet glikoza dönüşür. Maltoz ayrıca maltaz enzimi tarafından da sindirilebilir.

İçerdiği glikoz monomerleri sebebi ile nişastanın kan şekerine doğrudan etkisi bulunmaktadır.

2.4.1.1 Nişasta türevleri

Nişasta asit, enzimler veya bunların bir birleşimi ile hidroliz edilip parçalanabilir. Bu dönüşümün derecesi nişastadaki glikozid bağların kopma yüzdesi olan *dekstroz eşdeğeri* (DE) ile nicelenir. Bu şekilde üretilen gıda ürünleri arasında aşağıdakiler sayılabilir:

- Maltodekstrin az hidroliz edilmiş (DE 10-20) bir nişasta ürünüdür, kıvamlandırıcı olarak kullanılır.

- Çeşitli mısır şurupları (DE 30-70) işlenmiş gıda ürünlerinde tatlandırıcı ve kıvamlandırıcı olarak kullanılırlar.
- Dekstroz (DE 100) ticari glikoz, nişastanın tam hidrolizi ile elde edilir.
- Yüksek früktozlu şurup dekstroz çözeltisinin glikoz izomeraz enzimi eklenerek glikozun büyük oranda früktoza dönüştürülmesi yoluyla üretilir. Tatlandırılmış içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılır [17].

TATLANDIRICILAR

Günümüzde tüketiciye sunulan gıdalar birçok kimyasal madde içermektedir. Bu kimyasal maddelerden çoğu gıdanın doğal bileşenleri olup, karbohidratlar, yağlar, proteinler, vitaminler ve mineraller olarak sınıflandırılmaktadır. 19. yüzyılda başlayan endüstrileşme paralelinde gıda katkı maddelerinin kullanımında da artış belirmiştir. Bu yüzyılda gıdalara katılmaya başlayan benzoik asit, sodyum karbonat, sakarin gibi maddeler, günümüzde de gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. 20. Yüzyılda gıda üretiminin artması ile gıda katkı maddelerinin kullanımında da önemli artışlar gözlenmiştir. Örneğin, islenmiş peynir yapımında sitratlar, fosfatlar gibi emülsifiye edici tuzlar kullanılmış, emülgatör katımı ile margarin yapımı giderek kolaylaşmış, gıdaların duysal kalitesini geliştirmek amacıyla lezzet maddeleri ve lezzet arttırıcılardan yararlanılmaya başlanılmıştır. Katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirilmeleri konusu önem kazandıkça, özellikle gıda boyalarının kullanımlarına kısıtlamalar getirilmiştir [18].

Tarihsel süreç içerisinde katkı maddeleri her zaman yararlı amaçlar için kullanılmamışlardır. Pek çok eski kaynakta un, çay, şarap ve biranın yaygın biçimde tağşiş edildikleri durumlar belirtilmektedir. Bu nedenle de söz konusu dönemlerde katkıların zararlı veya ucuz dolgu maddeleri olarak kullanılmalarını önlemek amacıyla tüzükler, yasalar çıkarılmıştır. Özellikle gıdalara boya katılmasının oldukça karışık bir geçmişi bulunmakta olup, civa, arsenik ve kurşun bileşikleri gibi toksik etkili maddelerin gıdaları boyamada kullanıldıkları rapor edilmektedir. Sütü korumak amacıyla formaldehitin, eti korumak amacıyla ise boraksın kullanımı, una beyaz renkte tozların katılması gibi örnekler de katkı maddelerinin gıdalarda uygulamaları konusunda yasal düzenlemeler yapılması gereğini ortaya çıkarmıştır.

Bu bilgiler ışığı altında gıda katkı maddelerinin tarihsel gelişimlerinin iki etki ile şekillendiği anlaşılmaktadır. Bunlardan birincisi gelişen teknoloji paralelinde gıda saklama yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan gereksinimdir. İkinci etki ise tüketici gözünde gıdanın mevcut kalitesinin daha iyi olarak algılanmasını sağlamaktır. Bu etkilerden ilki günümüzde gelişen uluslararası ticaret göz önüne alındığında gıda katkı maddelerinin teknolojinin vazgeçilmez bir parçası olmalarının nedenini açıklamaktadır.

İkinci etki ise daha farklı bir anlayışla ele alınmış olup, katkı maddelerinin gıdaların mevcut duyusal veya teknolojik özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılmalarını sağlamıştır. Bu amaçlar doğrultusunda gıda katkı maddelerinin dünyadaki pazarı 1900'lü yıllarda 10 milyar dolara ulaşmış olup, 21. yüzyılda bu pazarın daha da büyümesi beklenmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yürürlükte olan Gıda İlaç ve Kozmetik Yasası'nda 1958 yılında Gıda Katkı Maddeleri ile ilgili olarak yapılan değişiklik içerisinde verilen tanımda katkılar; “belirli bir amaçla kullanımları sonucunda doğrudan veya dolaylı şekilde gıdanın bileşeni haline gelen veya karakteristiklerini değiştiren maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nun ortak çalışmaları ile oluşturulmuş Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) tarafından verilen tanım ise oldukça ayrıntılıdır. Söz konusu tanımda, gıda katkı maddesi “tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depolama aşamalarında, gıdalara teknolojik (organoleptik dahil) amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddeler” olarak ifade edilmektedir. Bu tanım gıdalara istenilmediği halde bulaşan kirleticileri veya besleyici kaliteyi arttırmak amacıyla katılan maddeleri içermemektedir [18].

Gıda katkı maddeleri;

- Ürünün besin değerini korumalı,
- Kaliteyi iyileştirmeli,
- Atıkları azaltmalı,
- Tüketici kabul edilebilirliğini arttırmalı,
- Depolama kalitesini iyileştirmeli,

- Gıdanın hazırlanabilirliğini kolaylaştırmalıdır.

Gıda katkı maddelerinin;

- Kötü kalitede veya bozulmuş gıdayı maskeleyme veya hatalı ürün elde etme tekniğini gizleme,
- Gıdaları hatalı işleme, taklit gıda yapımı ve tüketiciyi aldatma,
- Ürünün besleyici değerini azaltma,
- İstenilen etkiyi oluşturacak teknik miktardan fazla kullanma gibi amaçlarla gıdaya katılmaları ve
- Katkıların yerini tutabilecek veya eşit derecede kabul edilebilir işleme ve ambalaj tekniklerinin varlığında kullanımları, yasal olmayan uygulanma biçimleridir.

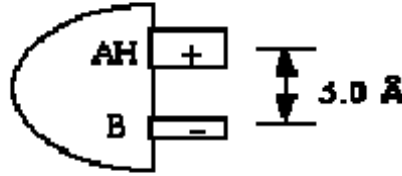
Günümüzde diyetlerdeki şekerin ve şeker içeren gıda maddelerinin tüketimindeki hızlı artış, uzun dönem sonra bazı sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yüksek oranda şeker tüketiminin insanlarda diş çürümelerine, aşırı şişmanlamaya, kalp hastalıklarına sebep olduğu, ayrıca doğal şekerin kan şekerini hızla arttırdığı ve buna bağlı olarak diyabetli hastalarda zararlı etkiler oluşturduğu görülmüştür. İnsan sağlığını önemli ölçüde tehdit eden bu hastalıkların tedavisi için, medikal tedavinin yanı sıra bilinen en etkili yol, aktivitenin artırılmasıyla birlikte diyetlerin düzenlenmesidir. Bu hastalıkların tedavisi için hastaların diyetlerinde şeker ve şekerli yiyeceklerin tüketimini kısıtlama yoluna gidilir.

Bunun sonucunda doğal şekerler, bazı durumlarda yerlerini tatlandırıcılara bırakmak zorunda kalmıştır.

Maddelerin kimyasal yapısı ve tatlılık arasındaki ilişki konusunda pek çok araştırmacı tarafından öne sürülen değişik teoriler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, 1967 yılında bu teorileri ele alarak ve birleştirerek yeni bir teori ortaya çıkarmışlardır.

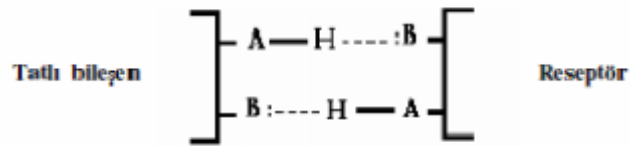
AH-B olarak ifade edilen söz konusu teoriye göre tatlı tadın oluşması için aralarında 0,3 mm mesafe bulunan proton verici ve proton kabul edici özellikleri olan bir moleküler sisteme gereksinim bulunmaktadır Tatlı tadın oluşması için gereken moleküler sistem Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu nedenle tatlı tadı veren tüm bileşikler oksijen veya azot gibi bir elektron sunucu (donör) atom (A) içermektedirler. Bu atom aynı zamanda kendisine tek bir kovalent bağ ile bağlı bir proton da içerdiğinden AH bir hidroksil, bir imin veya amin, veya bir metil grubunu temsil edebilmektedir. AH protonunun 3Å

uzağında ise genellikle oksijen veya azottan oluşan ikinci bir elektronegatif B atomu yer almalıdır.



Şekil 3.1 Tatlı tadın oluşmasını sağlayan moleküler sistem [18].

Bir maddenin tatlılık özelliğinin ise söz konusu AH-B sisteminin tat reseptör hücrelerinin membranında yer alan uygun bir sistemle temasa geçtiğinde olduğu öne sürülmektedir. Şekil 3.2’de tatlı tadın oluşumu gösterilmektedir. Gruplar arasındaki mesafede ve elektronik yapıda oluşan değişimler tatlılık özelliğinin oluşmasını sağladığı gibi bazen genel tat algısını değiştirerek tatlılığı tamamen ortadan kaldırmakta veya acılığa da çevirebilmektedir.



Şekil 3.2 Tatlı tadın oluşumu [18].

Tatlı tadını veren moleküllerin başında karbohidratlar gelmektedir. Ancak bütün karbohidratlar tatlı değildir. Monosakkaritlerden α -D Mannoz tatlı, β -D Mannoz ise acı bir tada sahiptir. Selibiyoz, bir disakkarit olmasına rağmen tatsızdır.

Aynı zamanda tatlılık şekerlere özgü değildir. Aminoasitlerin D izomerleri genellikle tatlı iken, L izomerleri tatsız ve acıdır.

Bunların dışında glikoller, alkoller, aldehitler, ketonlar, amitler, esterler, sulfonik asitler, halojenik asitler, kurşun ve berilyumun anorganik tuzları da tatlı tada karşı sinirler üzerinde uyarıcı etki yapmaktadır.

Çağlar boyunca zor bulunan bir madde olan şeker, son birkaç yüzyıl içinde kolay elde edilebilir olmuş ve insan beslenmesinin temel unsurlarından biri haline gelmiştir. İnsanlar tarafından çok sevilen şekerin kolay elde edilebilirliği, bol ve ölçüsüz

tüketilmesine yol açarak, aşırı şeker kullanımı ile ilişkili rahatsızlıkların da görülme sıklıklarını arttırmıştır.

Tat alma zevkinden mahrum kalmaksızın şekerin insan bedeni üzerindeki olumsuz etkilerinden kaçınmak gereksinimi, tatlandırıcıların günümüzde yoğun olarak kullanımları sonucunu beraberinde getirmiştir.

Tatlandırıcılar, başlangıçta şeker hastalarının tatlandırma gereksiniminin giderilmesi için kullanılmış olmakla birlikte, günümüzde fazla kilolular, vücut şeklini korumaya çalışanlar ve şekerin diş sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmak isteyenler tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Milyonlarca insan hem zayıflamak hem de şeker hastalığı nedeniyle yapay tatlandırıcı kullanmaktadır.

Bütün insanlar şekerli besinler (bal, çikolata, dondurma vs...) gibi besinleri tükettiklerinde daha mutlu oldukları ifade ederler. Çünkü yedikçe yemek isteğinizi arttıran şekerli besinler, tat açısında da beyninizde kazınırlar. Her defasında aynı tatlıyı yemek isterseniz dahi bıkmazsınız. Ancak günümüzde birçok ülkede önemli yeri olan şeker ve tatlıların aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, sağlıklı beslenme bilgisindeki eksiklikler ve ailelerin sağlıklı besinlere ayırdığı düşük bütçe; şişmanlık, şeker hastalığı, hipertansiyon, kalp-damar hastalıklarında hızlı bir artışa neden olmuştur. Böylece çok şeker içeren besinler şişmanlık ve şeker hastalarının tedavilerinde sınırlandırılmıştır. Ancak teknolojinin gelişimi ile besin sanayinde kalorisi düşük veya olmayan yapay tatlandırıcılar 19. yüzyılın sonlarında gündeme gelmeye başlamıştır.

İdeal tatlandırıcı şekerin duyuşal özelliklerini içeren, kullanırken ve kullandıktan sonra ağızda acı-metalik tat bırakmayan, kolay çözünen ve çözündükten sonra renksiz, kokusuz, ekonomik, ısıya dayanıklı, kalorisi düşük olmalıdır. En önemlisi; toksik, teratojenik, kanserojenik açıdan güvenli olmalıdır [19].

3.1 Tatlandırıcıların Sınıflandırılması

CAC, tatlandırıcı ifadesini “gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan madde” olarak tanımlamaktadır. Tatlandırıcı özelliğı bulunan maddeler farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değışik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Bu değışik özellikleri nedeni ile farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Örneğın,enerji

verme durumuna göre **besin değeri olan** (Çizelge 3.1) ve **besin değeri olmayan tatlandırıcılar** (Çizelge 3.2) olarak sınıflandırılabilirdiği gibi; genellikle bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler **doğal tatlandırıcı**, sentezleme yolu ile elde edilenler ise **yapay tatlandırıcı** olarak, ayrıca tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra su tutarak hacim verme özelliği bulunanlar **hacim verici tatlandırıcı**, çok düşük miktarda kullanıldıklarında bile şiddetli tatlılık oluşturma özelliğinde bulunanlar ise **yoğun tatlandırıcı** olarak ifade edilmektedir [18]. Şeker yerine kullanılan doğal ve yapay tatlandırıcılar ve bunların sakkarozla göre kütlece tatlılık dereceleri Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Besin Değeri Olan Tatlandırıcılar

<u>Besin Değeri Olan Tatlandırıcılar</u>
Sakkaroz
Glikoz
Fruktoz
<u>Şeker Alkolleri (Polioller)</u>
Arabitol, Eritritol, Glicerol, Isomalt, Laktitol, Maltitol, Mannitol, Sorbitol, Xylitol

Çizelge 3.2 Besin Değeri Olmayan Tatlandırıcılar

<u>Besin Değeri Olmayan Tatlandırıcılar</u>
Asesulfam Potasyum
Alitam
Aspartam
Siklamat
Glisiyirizin
Neotam
Sakarin
Stevya
Sukraloz

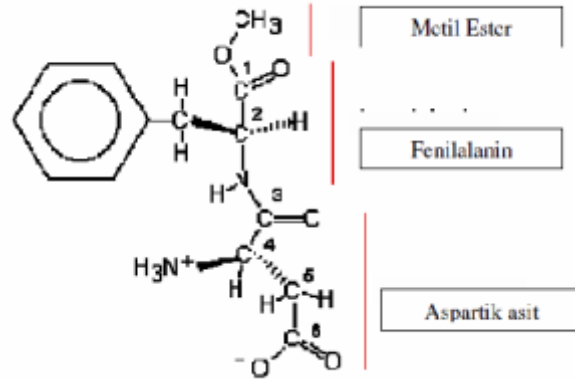
Çizelge 3.3 Doğal ve yapay tatlandırıcıların sakkaroz göre kütlece tatlılık derecesi

<u>Seker Yerine Kullanılan Tatlandırıcılar</u>			
Doğal Tatlandırıcılar		Yapay Tatlandırıcılar	
Madde Adı	Tatlılık Derecesi*	Madde Adı	Tatlılık Derecesi*
Monellin	3000	<u>Neotam</u>	8000
Taumatin	2000	<u>Alitam</u>	2000
Brazzein	800	<u>Neohesperidin dihydrocalkon</u>	1500
Curculin	550	<u>Sukraloz</u>	600
Pentadin	500	<u>Aspartam-Asesulfame Tuzu</u>	350
Stevya	250	Sakarın	300
Mabinlin	100	<u>Dulsin</u>	250
Glisiyridin	50	<u>Aspartam</u>	200
Fruktoz	1,7	<u>Asesulfam Potasyum</u>	200
Xylitol	1,0	Siklamat	30
Tagatoz	0,92	<u>Isomalt</u>	0,45-0,65
Maltitol	0,9	Laktitol	0,4
Eritritol	0,7	Arabitol	0,4
Sorbitol	0,6	*Sakkaroz Göre Kütlece (gram sakkaroz/gram tatlandırıcı)	
Glicerol	0,6		
Mannitol	0,5		
Nişasta Hidrolizatları	0,4-0,9		
Lactitol	0,4		

3.1.1 Aspartam

Aspartam, 1965 yılında Schlatter adlı araştırmacı tarafından Searle araştırma laboratuvarında aminoasitlerden gastrik peptid sentezlenmesinde oluşan ara ürünlerin saflaştırılması sırasında elde edilen N-L- α -aspartil-L-fenilalanin-1-metil esterinin tatlılık özelliğinin belirlenmesi üzerine tesadüfi olarak bulunmuştur. Aspartam sentezi L-aspartik asit ve L-fenilalaninden veya L-fenilalaninin metil esterinden başlamaktadır. Bilinen peptid sentezi yolu aspartam için de geçerli olup, aspartik asit için koruyucu gruba gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda susuz formilaspartik asit kullanılmakta ve fenilalanin metilester ile reaksiyona sokularak N-formilaspartilfenilalanin elde

edilmektedir. Oluşan bu maddenin klorür asidi ve metanol ile muamele edilmesi ile aspartam elde edilmektedir. Şekil 3.3’de aspartamın formülü görülmektedir.



Şekil 3.3 Aspartamın molekül formülü

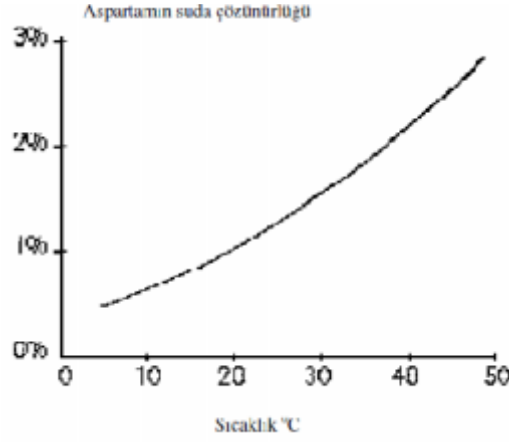
Kimyasal peptit sentezi dışında ticari olarak enzimatik yolla da aspartam sentezlenebilmektedir.

Aspartam, aspartik asit ve fenilalaninden oluşmuş amfoter yapıda bir dipeptittir. Sinonimi Aspartyl Fenilalanin Methyl Ester, kimyasal ismi N-(L-α-Aspartyl)-L-phenylalanine-1-methyl ester, kimyasal formülü $C_{14}H_{18}N_2O_5$, molekül ağırlığı 294,31’dir.

1 g’ı 4 kcal enerji verir. Tat karakteri sakkarozu benzer, hafif geç algılanır, ısıya dayanıksızdır. Aspartamın tatlılığının sakkarozun verdiği tatlı tada benzer olduğu belirtilmektedir. Aspartamın tat algısı gecikmiş olarak ortaya çıkmakta ve uzun sürmektedir. Ayrıca aspartamın özellikle meyve lezzetini artırıcı özelliği olduğu da bilinmektedir.

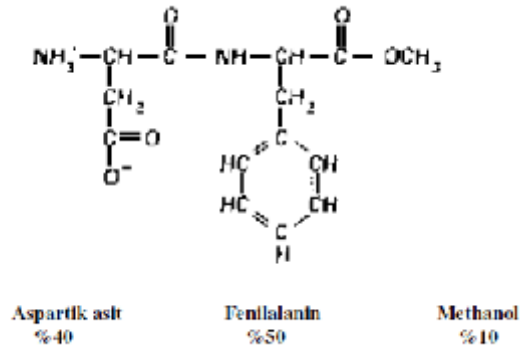
Aspartam, % 4’lük sakkaroz çözeltisinden 150 – 200 kat daha tatlı olup, beyaz toz yapıda ve kokusuz bir tatlandırıcıdır. Suda çok az oranda (25°C de % 1 düzeyinde), alkolde ise belli oranda çözünmekte, katı ve sıvı yağlarda ise çözünmemektedir.

Aspartamın sudaki çözünürlüğü pH’ya bağlı olup, izoelektrik noktası olan pH 5.2’de ve üzerinde (1g/100mL) düşük çözünürlüğe sahiptir. Aspartamın sudaki çözünürlüğü sıcaklığa da bağlı olup, Şekil 3.4’de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça çözünürlük de artmaktadır [18].



Şekil 3.4 Aspartamın sudaki çözünürlüğü-sıcaklık ilişkisi

Aspartamı meydana getiren bileşikler aspartik asit, fenil alanin ve metanol, aspartam oral yolla tüketildiğinde iki şekilde metabolize olur. Aspartam ya bağırsakta proteolitik ve hidrolitik enzimlerle aspartat (%40), fenilalanin (%50) ve metanole (%10) kadar yıkılır. Aspartamın yıkım ürünleri Şekil 3.5'te görülmektedir. Bu bileşenler aminoasit ve metanolün absorpsiyonuna benzer şekilde absorbe olur ya da önce bir demetilasyon ile metanol ve aspartil fenilalanin dipeptidine yıkılır. Dipeptit bölümü, dipeptitlere özel bir transport mekanizması ile absorbe olduktan sonra mukoza hücresinde hidroliz olarak portal dolaşıma karışır. Metanol ise bilinen şekilde emilir. Bu bileşenler yaygın olarak tüketilen birçok gıdanın yapısında da bulunmakta ve insan vücudunda et, peynir, balık, sebze, meyve suyu ve anne sütünden de aynı şekilde metabolize edilmektedir.



Şekil 3.5 Aspartamın kimyasal yapısı ve yıkım ürünleri

Aspartam, yapısında bulunan dipeptidin vücutta tamamen sindirilmesi nedeni ile enerji veren (4 kcal/g) bir madde olmakla birlikte sakkarozaya göre çok düşük miktarlarda kullanıldığından sağladığı kalori düşük düzeydedir.

Aspartamın stabilitesi pH, sıcaklık ve nem gibi faktörlerden etkilenmekte olup, yüksek sıcaklık ve asidik ortamlarda ester bağı hidroliz olarak aspartilfenilalanin ve metanol oluşmaktadır. Oluşan metanol aspartamın diketopiperazine dönüştürülmesiyle ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Diketopiperazin de hidroliz olarak aspartilfenilalanine dönüşmekte ve daha ileri safhada ise kendini oluşturan iki aminoasit; aspartik asit ve fenilalanini oluşturmaktadır. Bu oluşan maddeler tatlı tada sahip olmadıkları için gıdada tatlılık kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle aspartamın yüksek sıcaklık ve uzun süre depolama gerektirmeyen ürünlerde kullanılması önerilmektedir. 110°C'nin üzerinde bozunma meydana gelir. Kuru ürünlerde aspartamın stabilitesinin yüksek olduğu, nem miktarı arttıkça stabilitenin azaldığı saptanmıştır. % 8 ve altındaki nem düzeylerinde aspartamın oldukça stabil olduğu belirtilmektedir. Nemin bulunmadığı şartlarda aspartam saf formunda birkaç yıl depolanabilir. Minimum raf ömrü optimum şartlarda 5 yıldır. Bu yüzden toz karışım gibi kuru uygulamalarda ya da tablet formunda hem üretim prosesi boyunca hem de ürünün raf ömrü boyunca stabilite son derece iyidir. Nem ve depolama göz önüne alındığında 30°C'de % 70 nispi nemde 6 ay depolamada aspartamda bozunma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 20°C'de % 40 nispi nemde 1 yıl depolandığında % 2 den daha az bozunma olduğu gözlenmiştir

Protein yapısında olmasına rağmen aspartam, içecek sektörü başta olmak üzere birçok gıda sektöründe başarılı bir stabiliteye sahiptir. Ortamın pH'sının raf ömrü üzerine etkisi yadsınamaz. Fosforik asit içeren ürünlerde en kısa raf ömrüne sahiptir. Stabilite için optimum pH 4,2 civarındadır. Ancak pH 3–5 civarında da stabilitesini koruyabilir. Aspartamın bazik pH değerine sahip sıvılarda kullanımı pek tavsiye edilmez. Aspartam stabilitesinin korunması açısından uygun pH seviyeleri ve kontrollü depolama sıcaklıkları önem taşımaktadır.

Aspartam, diğer karbohidratlar ve yüksek tatlılık potansiyeline sahip sakkaroz, glikoz, fruktoz ve sakarin ile birlikte kullanıldığında çok çeşitli düşük kalorili ürünler elde edilebilmektedir. Aspartam diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki göstererek, kullanılan toplam tatlandırıcı miktarının azaltılmasını da sağlamaktadır.

Aspartam, asesulfam K ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gözlenmekte olup, çeşitli gıdalarda yapılan çalışmalarda aspartam / asesulfam K karışımı için en etkili oranın 1:1 olduğu belirlenmiştir.

Gazlı içecekler, tatlılığı ve tüketimi fazla olan gıda maddeleridir. Aspartamın gazlı içecekler ile uyumu; pH, depolama zamanı, aspartamın dağılım zamanı ve konsantrasyon ile ilişkilidir. Gazlı içeceklerde kullanılan aspartam düzeyi pH ve gazlı içecek cinsine göre farklılık göstermektedir.

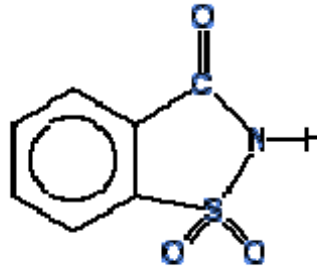
Tahıl ürünlerinde, bir kısım şeker yerine aspartam kullanılmaktadır. Kullanılan aspartam ile şeker miktarı azaldığı için daha fazla tahıl ile daha az enerji eldesi mümkün olabilmektedir. Aspartam tahıl ürünleri üzerine püskürtme ile verilebilmektedir.

Şekerlemelerde (şekersiz naneli şekerler, sert şekerlemeler, çikolata, sakız, yumuşak şekerlemeler vb.) aspartamın diş çürümelerine neden olmaması, kalori değerinin düşük olması nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Şeker oranı yüksek olan bu ürünlerde aspartam kullanımı ile teknolojik problemler de önemli düzeyde çözümlenmiş olmaktadır.

Aspartam bunların dışında tatlı turşularda, kremalarda, reçel, marmelat, jöle ve benzeri pasta dolgu maddelerinde de kullanılmaktadır [18].

3.1.2 Sakarin

Sakarin 1879 yılında keşfedilmiş ilk kalorisiz yapay tatlandırıcıdır. Uzun yıllar tek başına veya diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanılmıştır. Halen 90'ın üzerindeki ülkede kullanımına izin verilmektedir. Sakarinin moleküler yapısı Şekil 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.6 Sakarinin molekül formülü

Pek çok ülkede ticari olarak Resmen-Fahlberg işlemi ile üretilen sakarin, ABD'de Maumee işlemi ile üretilmektedir. Resmen-Fahlberg işleminde toluen, klorosulfonik asitle reaksiyona sokularak izomerik toluen-sülfoklorür oluşturulmakta, daha sonra amonyak varlığında 2-toluen sülfoklorür 2-toluensulfonik asit amid üretilmektedir. Söz konusu bileşik uygun koşullarda sakarine okside olmaktadır [18].

Maumee işleminde ise reaksiyon antranilik asit veya metil esteri ile başlamakta ve antranilik asit, sodyum nitrit varlığında diazonyum bileşimini oluşturmaktadır. Söz konusu maddenin kükürt dioksit ile reaksiyona girmesi ve amonyakla reaksiyonu sonucunda sakarini oluşturacak olan 2-klorofenilsülfonik asit metil esteri üretilmektedir.

Sakarın sakkaroz çözeltisinden 300 kat daha tatlıdır. Kimyasal ismi 1,2-benzisotiazolin-3-on-1,1-dioksit ($C_7H_5NO_3S$) olan sakarın beyaz, kristal yapıda, kokusuz bir tozdur. Erime noktası 228-230°C, sudaki çözünürlüğü 20°C’de 2 g/L, 100°C’de ise 40 g/L’dir. Sakarinin sulu çözeltisi asidik karakterde olup, oda sıcaklığında doymuş çözeltisinin pH’sı 2’dir. Alkali hidroksit veya karbonat çözeltilerinde sakarinin kolay çözündüğü ve tuzlarını oluşturduğu saptanmıştır. Ticari olarak asit formu bilinen sakarinin gıda ve içecek formülasyonlarında genellikle tuzları kullanılmaktadır. En çok rastlanan tuzları sodyum ve kalsiyum olup, potasyum ve amonyum tuzları da bulunmaktadır. Sodyum sakarinin sudaki çözünürlüğü sakarine göre daha yüksek olup, oda sıcaklığında 1000 g/L, 100°C’de 3000 g/L’dir. Kalsiyum sakarinin ise oda sıcaklığında suda çözünürlüğü 370 g/L, 100°C’de ise yine 3000 g/L’dir.

Sakarın beyaz, toz yapıda kuru şartlarda stabil olan bir tatlandırıcıdır. Tadım sonrası ağızda bıraktığı acı ve metalik tat, siklamat, aspartam, asesulfam K veya sukraloz gibi tatlandırıcılarla birlikte kullanılarak maskelenebilir. Sakarın aseton, etanol ve gliserinde çözünmekte, kloroform ve dietileterde ise oldukça az çözünmektedir.

Sakarın kullanımının bazı avantajları;

- Tatlılık gücünün yüksek olması (tatlılık derecesi % 10’luk sakkaroz çözeltisinden 200 kat daha fazladır)
- Yüksek stabiliteye ve uzun raf ömrüne sahip olması
- Diyabetli hastalar için uygun olması
- Kalorisinin düşük olması
- Ürünlerde yaygın olarak kullanılabilmesi şeklinde sıralanabilir.

Sakarinin ekstrem koşullarda da (150°C ve üstü sıcaklıklarda, pH 2-8 aralığında) stabilitesini koruyabilmesi nedeniyle unlu mamuller, salata sosları, reçeller, gazlı içecekler, meyve konsantreleri, konserve gıdalar ve diğer birçok gıdanın üretiminde kullanılabilir. Buna karşın pH 2’nin altında ve 380°C sıcaklıkta hidrolize uğrayarak parçalanan sakarinden tatlı tada sahip olmayan iki asit ortaya çıkmakta ve azot oksit ve kükürt gibi toksik bileşikler oluşmaktadır.

Wolf (1979)'e göre ürüne 8 g/100 g sakkarozaya denk gelecek miktarda sakarin katıldığında tatlılık yoğunluğu azalır ve tadım sonrası sakarinin ağızda bıraktığı acı tat artar. Fakat sakarin siklamatla 1:10 oranında karıştırılıp kullanılırsa tadım sonrası izlenim azalır. Yoğurt gibi süt ürünlerinde sakkaroz yerine sakarin kullanılabilir, ancak bu durumda aljinat, pektin veya karagen gibi viskozite arttırıcı ajanların kullanılması gerekmektedir.

Hyvoenen ve Slotte (1983) farklı tatlandırıcıların yoğurdun kalitesi üzerine etkisi konusunda yaptıkları çalışmada tatlandırıcıları süte inkübasyondan önce veya fermentasyon sırasında eklemişlerdir. İnkübasyondan sonra katılan sakarin haricindeki tüm tatlandırıcılar yoğurtta hoş bir tat sağlamıştır. Buna karşın sakarin, ksilitol ile karıştırılarak kullanıldığında tadım sonrası oluşan acı tat maskelenebilmiştir. Buna ek olarak sorbitol süte fermentasyondan önce katıldığında starter kültür çoğalmasını engellemiştir ve sorbitol ancak sakkaroz ile birlikte kullanıldığında istenen yeterli tadı sağlamıştır ve araştırmacılar hazırladıkları bazı formülasyonların kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Bu formülasyonlar, % 8 ksilitol, % 7 fruktoz ve % 0,07 siklamat veya % 4 ksilitol ve % 0,07 sakarin/% 8 sakkaroz şeklindedir.

Sakarin ile ilgili toksikolojik çalışmalar 1879 yılında, bulunmasından hemen sonra başlamıştır. Fareler üzerinde yapılan toksisite testlerinde sakarinle mesane, rahim, yumurtalık ve cilt kanseri arasında ilişki bulunmuş, bu nedenle 1977 yılında FDA tarafından çıkarılan *Deaney hükmü* göz önüne alınarak sakarinin kullanımı yasaklanmıştır. 1990'lı yılların sonlarına doğru FDA ve Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), Kalori Kontrol Konseyi (CCC) tarafından sakarin ile sadece erkek farelerde mesane kanseri arasında bir ilişki olduğu, fakat insanlarda kanser gelişmesi için aynı mekanizmanın işlemediği konusunda ikna edilmiştir. Bununla birlikte sakarin yerine tüketilecek bir tatlandırıcı bulunmaması ve tümör oluşturan maddelerle ilgili de *minimus doktrinin* yürürlüğe girmesi nedeni ile sakarinin kullanılmasına tekrar izin verilmeye başlanmıştır.

2000 yılında NIH, Ulusal Toksikoloji Programında sakarini kanserojen listesinden çıkarmıştır. Daha sonraki yıllarda Ulusal Kanser Enstitüsünün (NCI) yaptığı bir çalışmada önemli miktarda sakarin tüketen kişilerde mesane kanseri riskinde artış olduğuna dair kanıtlar bulunmuş ve bu tüketicilerin aşırı miktarda sofralık tatlandırıcı ve diyet soda tükettikleri belirlenmiştir. Bahsi geçen miktar 6 ve üstü porsiyonda sofralık tatlandırıcı ve 2-8 porsiyon diyet içecek tüketimi olarak belirlenmiştir. Günümüzde

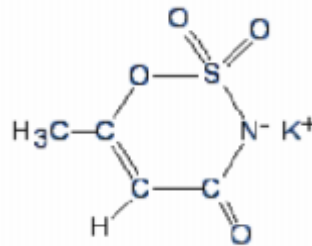
sürdürülmekte olan toksikolojik değerlendirmeler sonucunda sakarin düşük potansiyele sahip kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır.

Sakarin vücuda alındığında yavaşça absorbe edilmektedir. Fakat metabolize olmamakta ve böbreklerde bir değişikliğe uğramadan vücuttan atılmaktadır. JECFA tarafından vücut ağırlığı başına 0-2,5 mg/kg günlük tüketilebilir miktarı (ADI) değerinde tüketilen sakarinin insanlarda kanser riskini arttırmayacağı saptanarak gıdalarda kullanımına izin verilmiştir [18].

3.1.3 Asesulfam K

Asesulfam K, 1967 yılında Clauss ve Jensen adlı araştırmacılar tarafından tesadüf sonucunda bulunmuş bir tatlandırıcıdır. Araştırmacılar, butin ve florosulfonil izosiyanatla yapılan çalışmalar sırasında sentezlenen dihidrookzatiyazon dioksitlerin tatlı tada sahip olduğunu, kısa zincirli alkil grupları içeren bileşiklerin ise maksimum tatlılığa sahip olduğunu saptamışlardır. Bu bileşikler içerisinde 6-metil-1,2,3-okzatiyazin-4(3H)-on-2,2-dioksit adlı bileşiğin kolay sentezlenmesi nedeniyle yapay tatlandırıcı olarak kullanılması önerilmiştir.

Kapalı formülü ($C_4H_4NO_4SK$) olan asesulfam K'nın molekül ağırlığı 201,2 dir. Beyaz, kokusuz ve kristal yapıda olan asesulfam K'nın saf ve katı halinin oda sıcaklığındaki raf ömrü oldukça uzundur. Asesulfam K'nın kimyasal yapısı Şekil 3.7'de görülmektedir.



Şekil 3.7 Asesulfam K'nın kimyasal yapısı

Asesulfam K'nın sudaki çözünürlüğü oldukça yüksek olup, çözünürlük sıcaklıkla birlikte artmaktadır. Asesulfam K, pH 3-7 arasında stabil iken, pH 3'ün altına düştüğünde çok düşük miktarda parçalanmanın başladığı saptanmıştır. Asesulfam K gıdalara ve içeceklere uygulanan normal işlem koşullarında parçalanmamakta, pişirme sırasında, pastörizasyon veya mikrodalga uygulamalarında da yapısında bir değişiklik olmamaktadır [18].

Asidik gıda ve içeceklerde nötr olanlara kıyasla aynı konsantrasyonda asesulfam K kullanımı ile daha yüksek tatlılık elde edilmektedir. Asesulfam K tek başına tatlandırıcı olarak kullanılabildiği gibi diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanıldığında sinerjistik etki de oluşturmaktadır. Bu maddenin, sorbitol, izomalt ve fruktoz ile birlikte sinerjistik etki yarattığı, siklamat ve aspartam ile de aynı etkinin söz konusu olduğu, sakarin ile bu etkinin çok düşük bulunduğu saptanmıştır. Sinerjistik etkiye en uygun bileşim olan asesulfam K / aspartam karışımı için 1:1 veya 1:5 olarak belirlenmiştir.

Asesulfam K'nın şeker alkolleri ile karışım olarak kullanıldığı durumlarda hoşça giden tatlar elde edilmiştir. Özellikle asesulfam K / sorbitol karışımında dolgun bir tatlılık elde edilmiş, bu nedenle söz konusu karışımın şekerlemelerde, meyve preparatlarında ve viskozite gerektiren gıdalarda kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir.

Asesulfam K, vücutta metabolize edilemez ve idrarla değişmeden dışarı atılır. Yapılan farmakolojik çalışmalar tüketilen asesulfam K'nın % 95'inin değişmeden idrarla dışarı atıldığını ve bu nedenle metabolize edilmediği için enerji vermediğini, aynı zamanda asesulfam K tüketiminin vücuda potasyum alımını etkilemediğini ortaya koymuştur.

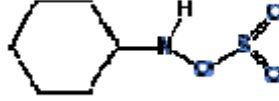
Asesulfam K, Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA) tarafından ilk olarak 1983 yılında güvenilirlik açısından değerlendirmeye alınmıştır. FDA ilk olarak 1988 yılında asesulfam K'nın alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasını onaylamıştır. FDA ve JECFA, asesulfam K için ADI 15 mg/kg olarak belirlemiş, daha sonra Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) 1985 yılında tatlandırıcılar hakkında kapsamlı bir değerlendirme yayınlamış ve komite asesulfam K'nın gıda ve içeceklerde kullanılmasını onaylamış, ancak günlük tüketilebilir miktarın en çok 9 mg/kg olmasını önermiştir. Böylelikle asesulfam K, Avrupa'da 1985 yılından ve ABD' de 1988 yılından bu yana kullanılmaktadır. FDA, asesulfam K'nın güvenliğini 2003 yılının kasım ayında tekrar onaylamış ve genel amaçlı kullanımına onay vermiştir.

Asesulfam K'nın güvenilirliği 15 yıldan uzun süren 90'nın üzerinde çalışma ile resmi kurumlar tarafından onaylanmış ve aralarında Kanada, İngiltere, Fransa, İsviçre, İtalya, Belçika'nın da bulunduğu 90'nın üzerinde ülkede kullanılmaya başlanmıştır [8].

3.1.4 Siklamat

1937 yılında Sveda tarafından siklohegzil sülfamik asidin tatlı tat verme özelliği belirlendikten sonra 1950 yılında ticari olarak kalsiyum ve sodyum tuzları şeklinde

kullanılmaya başlanan bir tatlandırıcıdır. Siklamat üretimi, siklohegzilaminin sulfamik asitle reaksiyona girerek N-siklohegzil-N-siklohegzilamonyum sülfomat oluşturmasıyla başlamaktadır. Daha sonra sodyum veya kalsiyum hidroksit kullanılarak siklohegzilamin serbest hale getirilmektedir. Siklamatin molekül formülü Şekil 3.8’de görülmektedir.



Şekil 3.8 Siklamatin molekül formülü

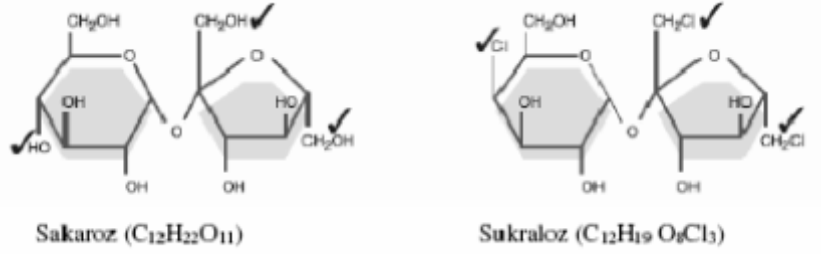
Siklohegzil sülfamik asit ($C_6H_{13}NO_3S$) yapısındaki siklamat, $169-170^{\circ}C$ ’de erirken, tuzlarının erime noktası kesin olarak tanımlanmamış olup, yüksek sıcaklıklarda bozundukları saptanmıştır. Sodyum siklamat ($C_6H_{12}NNaO_3S$) tatlandırıcı olarak kullanılan en yaygın siklamattır. Beyaz, kokusuz, kristal formdaki madde $260^{\circ}C$ ’de bozulmaktadır. Oda sıcaklığında sudaki çözünürlüğü ağırlıkça % 20 olan sodyum siklamatin organik çözenlerdeki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kalsiyum siklamatin ($C_6H_{24}CaN_2O_6S_2 \cdot 2H_2O$), sodyum siklamata kıyasla tatlılık özelliği açısından daha az önemli olduğu bildirilmektedir. Siklamatlar pH 2-10 arasında hidrolitik parçalanmaya karşı stabiliteleri yüksek olduğundan gıda işlemedeki koşullardan etkilenmemekte ve raf ömrü konusunda problem oluşturmamaktadır.

Siklamat değişmeden böbreklerden atılmakla birlikte bağırsak bakterileri tarafından metaboliti olan siklohegzilamin oluşabilmesi nedeniyle FAO/WHO ve FDA’nın gıda katkı maddeleri üzerinde çalışan Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) bu konu üzerinde çalışmaların yapılmasını önermiştir. 1984 yılında FDA’nın kanser değerlendirme komitesi yapılan birçok çalışmada siklamatin kanserojen olmadığı kanısına varmış ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmasını tekrar onaylamıştır.

Dünya üzerinde 40’tan fazla ülkede kullanılmakta olan bu tatlandırıcının ADI değerini JECFA 1980 yılında 4 mg/kg olarak belirlemiş, bu oran 1982 yılında 10 mg/kg vücut ağırlığına çıkarılmış ve günümüzde vücut ağırlığı başına 11 mg/kg olarak kabul edilmiştir [18].

3.1.5 Sukraloz

Sukraloz, ilk kez 1976 yılında sakkarozun 1. 4., ve 6. pozisyonlarının bir prosesle seçici olarak klorlandırılmasıyla elde edilmiştir. Sukraloz, 1,6-dikloro-1,6-dideoksi-1-D-fruktofuranozil-4-kloro-4-deoksi-D-galaktopiranozit ($C_{12}H_{19}O_8Cl_3$) yapısında bir madde olup, triklorogalakto sakkaroz olarak da bilinmektedir (Şekil 3.9). Halojenasyonun karbohidratların tatlılıklarını arttırdığı belirlendikten sonra pek çok klorlandırılmış ve bromlandırılmış yoğun tatlandırıcı etkisi olan mono ve disakkarit keşfedilmiştir.



Şekil 3.9 Sakkaroz ve sukralozun molekül formülleri

Sukralozun sudaki çözünürlüğü (283 g/L) oldukça fazla olduğundan özellikle alkolsüz içkilerde kullanılmaktadır. Sulu çözeltide çok stabil olması nedeniyle bu formda satılmaktadır. Bilinen ticari adı Splenda'dır.

Sukraloz sofralık şekerden yapılmış ve enerji vermeyen tek tatlandırıcıdır. Seyreltik sakkaroz çözeltilerine kıyasla 500–600 kere daha tatlı olan sukralozun tatlılık etkisinin aspartam gibi gecikmiş ancak kalıcı olduğu belirlenmiştir. Tat profili sakkarozla oldukça yakındır. Ağızda tadım sonrası izlenim bırakmaz. Geniş bir pH aralığında ve yüksek sıcaklıklarda da stabil olan sukraloz, pastörizasyon, aseptik dolum ve diğer yüksek sıcaklık gerektiren üretim proseslerinde stabilitesini korur. Böylece sukraloz içeren ürünlerde ısıtım işlemi sonrası tat kaybı görülmemekte, aynı zamanda fırınlama veya pişirme sırasında sakkarozun karakteristik özellikleri oluşmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda fırın ürünleri, meyve konserveleri, reçel ve jölelerde proses ve depolama süresince sukraloz miktarında ölçülebilir kayıpların meydana gelmediği belirlenmiştir.

Sukralozun ilk olarak 1991 yılında Kanada'da, 1998 yılında Amerika'da ve 2003 yılında da Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımına izin verilmiştir. 1998 yılında sütlu tatlılar, şekerlemeler, dondurmalar, sakızlar ve alkolsüz içecekler dahil 15 farklı gıda üretiminde kullanılması, 1999 yılından sonrada genel amaçlı olarak kullanılması FDA

tarafından onaylanmıştır. Günümüzde Avusturya ve Meksika'yı da kapsayan 80'den fazla ülkede kullanılmaktadır. 20 yılı aşkın süre boyunca insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan 110'un üstündeki çalışmalar, sukralozun insanlarda kanserojen, reproduktif veya nörolojik risk oluşturmadığını ve tüketiminin güvenli olduğunu ortaya koymuştur [18].

3.1.6 Taumatin

Taumatin, "katemfe" denilen bir Batı Afrika bitkisi olan *Thaumatococcus danielli*'nin meyvesinden elde edilen ve tatlılık özelliği 207 amino asit molekülü içeren proteinden kaynaklanan bir maddedir. Seyreltik sakkaroz çözeltisine kıyasla 3500 kez daha tatlı olan taumatinin oluşturduğu tatlılık etkisi yavaş gelişmekte ve kalıcı olup, tadım sonrası ağızda meyan köküne benzer bir tat bırakmaktadır.

Taumatin, stabilitesini geniş bir pH aralığında korur. Sıcaklığa karşı stabil olmaması nedeni ile yüksek sıcaklıkta ısıtılacak ürünlerde kullanımı uygun değildir. Sudaki çözünürlüğü de oldukça yüksek olup >1000g/L'lik çözeltisinin bile hazırlanması mümkündür.

Taumatinin yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasına İsrail, Japonya ve Avrupa Birliği ülkelerinde izin verilmekte olup, Amerika'da içeceklerde, reçel ve jölelerde, süt ürünlerinde, instant kahve ve çaylarda ve cikletlerde aroma arttırıcı olarak kullanılmasına izin verilmektedir [18].

3.1.7 Neohesperidin Dihidrokalon (NHDC)

NHDC, düşük kaloriye ve yüksek yoğunluğa sahip bir tatlandırıcıdır. NHDC' nin çok düşük konsantrasyonları bile aromayı değiştirmekte ve arttırmaktadır. Özellikle portakal, greyfurt, limon gibi turuncgil meyvelerinde yaygın olarak bulunan, 2, 3, 4, 5-tetrahidroksi-4-metoksidihidrokalon-4-neohesperidesit ($C_{28}H_{36}O_{15}$ molekül ağırlığı 612,6 g) yapısında bir flavanoid olup, tatlı hidrokalonlar içerisinde tatlılık özelliği en fazla olanıdır.

Erime noktası 152-154°C, sudaki çözünürlüğü 20 g/L olan NHDC, yüksek sıcaklığa ve asidik şartlara dayanıklıdır. Süre-tatlılık şiddeti çalışmaları, NHDC'nin tat profilinin sakkaroz benzemediğini ve tadın gecikerek ortaya çıktığını ve tadım sonrası izlenimde ağızda mentol benzeri tatlılık bıraktığını ortaya koymuştur.

Avrupa Birliğinde NHDC'nin enerjisi azaltılmış ve/veya şekerli yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasına 1994 yılında izin verilmiştir. Amerika'da NHDC'nin aroma artırıcı olarak kullanılmasına onay verilmesine rağmen tatlandırıcı olarak kullanımına izin verilmemiştir. JECFA henüz bu tatlandırıcı için ADI değeri belirlememiştir [18].

3.1.8 Alitam

Alitam, Pfizer Inc. firması tarafından geliştirilen ve (L-aspartil-N- (2,2,4,4-tetrametil-3-tietanil)-D-alanin), ($C_{14}H_{24}O_4N_3S_{21}.2H_2O$) yapısında bir madde olup, yoğun tatlandırıcı etkisi olan ve L-aspartik asit ile D-alaninden oluşan bir dipeptid türevidir.

Erime noktası 100°C, oda sıcaklığında ve pH 5 de suda çözünürlüğü 130 g/L olup, daha yüksek ve düşük pH'da ve daha yüksek sıcaklıkta çözünürlüğü artmaktadır. JECFA alitamın kanserojen olduğuna dair herhangi bir kanıt olmadığı kararına varmış ve denek olarak kullanılan köpekler üzerinde 18 ay süren çalışmalar sonucunda ADI değeri 0-1 mg/kg olarak kabul edilmiştir.

Alitamın birçok gıdada ve içekte kullanılmasına Avustralya, Şili, Kolombiya, Endonezya, Yeni Zelanda, Meksika ve Çin'de izin verilmektedir. Bunun dışında birçok ülkede üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Alitam da diğer tatlandırıcıların kullanıldığı hemen hemen her alanda kullanılabilir. Bunların başında; toz içecekler, süt ürünleri, soğuk ve sıcak içecekler, sakız ve şekerlemeler, diş macunları gelmektedir [18].

3.1.9 Steviosit

Paraguay ve Brezilya'da yetişen ve acı içecekleri tatlandırmak amacıyla *Steviarebaudiana Bertoni* adlı bitkinin yapraklarından izole edilen bir glikozittir.

Yapraklarının asırlardan beri gıda ve içecekleri tatlandırmak amacıyla kullanıldığı ifade edilen bu bitki Japonya, Kore, Tayvan ve Çin'de de yetiştirilmeye başlanmıştır.

Steviosit, aglikon steviol, ent-1,3-hidroksikaur-16-en-19-oik asit ve 2'si disakkarit olan soforoza bağlı 3 glikoz molekülü içeren bir glikozittir. Bu nedenle de 13-o-soforozilsteviol-18-o-glikozil ester ($C_{38}H_{60}O_{18}$) olarak adlandırılmaktadır. *Steviarebaudiana* yaprakları steviol dışında içlerinde en önemlisi rebaudiosit A olan diğer tatlı glikoziller de içermektedir. Stevia, yapraklarında bulunan diğer

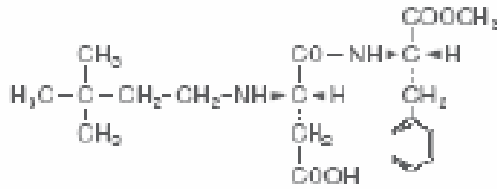
rebaudiositler, dulkozit ve stviolbiozittir. Kuru stevia yaprakları % 2-22 steviosit, % 1,5-10 düzeyinde derebaudiosit içermektedir. Steviositin erime noktası 196-198°C olup sudaki çözünürlüğü 1,2-1,3 g/L'dir.

JECFA 2004 yılında, steviosit için ADI değerini geçici olarak 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiş ve yapılacak çalışmaların 2007 yılına kadar süreceğini belirtmiştir.

Bugün Japonya, Paraguay ve Brezilya'yı da kapsayan 10 ülkede Steviositin tatlandırıcı olarak kullanımına izin verilmiştir. Amerika'da ise katkı maddesi veya tatlandırıcı olarak değil, sadece diyet destekleyici olarak satılmaktadır [18].

3.1.10 Neotam

Neotam (N-[N-(3,3-dimethylbutyl)-L-aspartyl]-L-phenylalanine-1-methyl ester), aminoasitler, aspartik asit ve fenilalaninden oluşan bir dipeptittir. Yapısal ve kimyasal olarak aspartama benzemektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Neotamın molekül formülü

Tatlılık derecesi aspartamdan 30–60 kat daha fazla iken, sakkarozdan 7000-13000 kez daha tatlıdır. Tatlandırıcı olarak kullanımının yanı sıra aromayı artırıcı (özellikle nane aroması) etkisi de vardır. Neotam üzerinde diğer tatlandırıcılarda olduğu gibi birçok kapsamlı çalışma yürütülmüştür.

FDA neotamın kullanımını onaylamadan önce 100'ün üzerinde bilimsel çalışmayı tekrar incelemiş ve Temmuz 2002'de genel amaçlı kullanımına izin vermiştir. JECFA 2003 yılında neotamı yeniden gözden geçirmiş ve ADI değerini 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiştir [18].

3.2 Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları

Gıdalarda kullanımına izin verilen tatlandırıcılar ile ilgili gerekli düzenlemeler 10 eylül 1994 tarihinde AB resmi gazetesinde yayımlanan ve 1996 yılında 96/83/EC numaralı

direktif ile son halini alan 94/35/EC numaralı Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi ile yapılmıştır. Bu direktifin ekinde son tüketiciye satılmasına ve gıdaların üretiminde kullanılmasına izin verilen 19 adet tatlandırıcının listesi yer almaktadır. Bu listede ayrıca tatlandırıcıların izin verilen kullanım alanları ve izin verilen maksimum miktarları da verilmiştir [18].

Ülkemizde ise 94/35/EC sayılı “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar“ Konsey Direktifi dikkate alınarak Avrupa Birliği’ne uyum çerçevesinde “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği” hazırlanmış ve son olarak yapılan değişikliklerle 21.09.2006 tarihinde 2006/45 tebliğ numarasıyla yayınlanmıştır.

Hazırlanan bu tebliğde amaç, gıda maddelerini tatlandırmak amacıyla kullanılan ve tüketiciye doğrudan sunulan tatlandırıcıların, gıda maddelerindeki kullanımını, ambalajlama ve etiketleme ile ilgili özelliklerini belirlemektir.

Bu tebliğde tatlandırıcıların kullanımı ile ilgili hükümlerden bazıları şu şekildedir:

- Enerjisi azaltılmış gıda üretiminde diş çürümelerine neden olmayan gıda maddeleri veya şeker ilavesiz gıdalarda, raf ömrünü uzatmak amacıyla ve diyet ürünlerin üretiminde şeker yerine tatlandırıcı kullanılır.
- Gıda maddelerinin üretiminde kullanılacak veya tüketiciye direkt sunulacak tatlandırıcılar, sadece bu tebliğ ekinde yer alan tatlandırıcılar olmalıdır.
- Gıdaların üretiminde kullanılacak olan tatlandırıcılar sadece bu tebliğ eklerinde belirtilen koşullar altında kullanılabilir.
- Aksine bir hüküm belirtilmedikçe, sağlık sorunu olan bebek ve küçük çocuk gıdaları da dahil olmak üzere Türk Gıda Kodeksi-Özel Beslenme Amaçlı Gıdalar Tebliğinde yer alan bebek ve küçük çocuk gıdalarında tatlandırıcı madde kullanılamaz.

BÖLÜM 4

ÜZÜM ve PEKMEZ

Bağcılık, Türkiye ekonomisinde ayrı öneme sahip bir tarımsal faaliyettir. Özellikle, diğer tarımsal ürünlerin yetiştirilmesine uygun olmayan tarım alanlarının değerlendirilmesine olanak tanıdığı için ayrı bir öneme sahiptir. Yaklaşık 7500 yıl önce Anadolu'da kültüre alınan asma bu topraklar üzerinde hüküm süren uygarlıklar döneminde daima tarımsal yapı içerisinde önemli bir yere sahip olmuş, her zaman insanımızın toplumsal ve ekonomik yaşamında önemli katkılarda bulunmuştur [20].

Asma, dünyada kültüre alınan en eski meyve türlerinden biri olup, bugün 10000'in üzerinde üzüm çeşidi bulunmakta ve bunun 1200'den fazlası ülkemizde yetiştirilmektedir. Ancak, günümüzde bu kadar çeşitten 50-60 kadarı ekonomik önem taşımaktadır.

Türkiye'de ekolojik koşullar dikkate alındığında Doğu Anadolu'da birkaç il ve yüksek yaylalar dışında her yerde bağcılık yapılabilmektedir. Bağ alanları ekilebilir tarım alanlarımızın % 3,1'ini bağ-bahçe alanının % 16'sını teşkil etmekte ve yıllık tarımsal milli gelirimizin % 6-7 si bağcılıktan sağlanmaktadır [20].

4.1 Üzüm ve Şıranın Bileşimi

4.1.1 Üzümün Çeşitli Kısımlarının Bileşimi

Asmanın meyvesi olan üzüm, salkım halinde sap kısmı ile daneler ve daneleri sap kısımlarına bağlayan çöplerden ibarettir. Şıra dane içinde olup danenin etli kısmı şıra ile doludur. Salkımı oluşturan çeşitli kısımların bileşimleri üzüm çeşidine ve olgunluk derecelerine göre değişiklik göstermektedir. Çizelge 4.1'de salkımın çeşitli kısımlarının bileşimi verilmiştir. Salkımda sap ve çöp kısmı genel olarak salkım ağırlığının % 3-7,

kabuk kısmını % 4-20 ve çekirdek kısmını % 0-6, danenin etli kısmını ise % 75-85 kısmını oluşturur [12].

Çizelge 4.1 Üzüm salkımının çeşitli kısımlarının % bileşimi [12].

Bileşenler	Salkım Kısımları			
	Saplar	Çekirdek	Kabuk	Etli Kısım
Su (g/100g)	55-80	30-45	65-75	65-85
Şeker (g/100g)	eser	eser	az	15-30
N'suz kuru madde (g/100g)	15-30	15-25	15-30	15-35
N'lu maddeler (g/100g)	2	6	2	0,2-0,5
Ham selüloz	5	28	4	Çok az
Kül (g/100g)	1-2	1-2	0,5-1	0,2-0,6
Tanen (g/100g)	2-5	2-8	0,4-4	eser
Tartarik asit	eser	-	-	0,4-0,8
Malik asit (g/100g)	0,05-0,25	-	az	0,3-1,2
Yağ (g/100g)	-	8-15	0,1	-

4.1.2 Şıranın Bileşimi

Üzüm şırasında bulunan maddelerin başlıcaları: Su, karbohidratlar, asitler, mineral maddeler, azotlu maddeler, renk maddeleri, fenolik maddeler, lipidler, aroma maddeleri, enzimler, vitaminler ve diğer maddelerdir. Yenilebilen kısımlarının kimyasal bileşimi Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Üzümün yenilebilen kısımlarının kimyasal bileşimi [12].

Bileşenler	Kaynaklar			
	a	b	c	d
Su (g/100g)	84,3	83,2	83,2	75-85
Karbohidrat (g/100g)	11,0	13,9	10,6	15-25
Toplam Asit (g/100g)	0,35	-	-	0,3-1,5
Ham Protein (g/100g)	0,47	0,7	0,3	0,03-0,17
Kül (g/100g)	0,33	0,4	-	0,3-0,5

a) Souci ve ark., 1981; Acar,1990’ dan

b) Watt ve Merril, 1963; Acar,1990’ dan

c) Paul ve Southgate, 1978; Acar,1990’ dan

d) Amerine ve ark., 1980

Üzüm meyvesinde enerji, protein, karbohidrat, ham selüloz, kalsiyum fosfor, potasyum ve askorbik asit miktarları üzüm suyuna ait değerlerden daha fazla olarak bulunurken, ham yağ, toplam kül ve demir miktarları ise üzüm meyvesi ve üzüm suyunda aynı olarak bulunmuştur. Üzüm ve üzüm suyunun bileşimi ve özellikleri Çizelge 4.3’de verilmiştir [12].

Çizelge 4.3 Üzüm ve üzüm suyunun bileşimi ve özellikleri [12].

Bileşim Maddeleri	Üzüm Meyvesi	Üzüm Suyu
Enerji (kcal/100g)	56	53
Nem (%)	84,4	85,2
Protein (%)	0,5	0,3
Ham Yağ (%)	0,2	0,2
Karbonhidrat (%)	14,4	14
Ham Selüloz (%)	0,2	--
Toplam Kül (%)	0,30	0,30
Kalsiyum (mg/100g)	6	5
Fosfor (mg/100g)	13	10
Demir (mg/100g)	0,2	0,2
Sodyum (mg/100g)	1	2
Potasyum (mg/100g)	130	45
Askorbik Asit (mg/100g)	4	--

4.1.2.1 Karbohidratlar

Şıra toplam kuru maddesinin büyük bir kısmını monosakkaritler oluşturur. Üzümde bulunan monosakkaritler: glikoz (üzüm şekeri) ve fruktoz (meyve şekeri) dur. Glukoz ile fruktoz, şıradaki şekerlerin % 99’unu, olgun tane ağırlığının ise % 12-27’sini oluşturur. Bu şekerler yapraklarda çoğunlukla sakkaroz şeklinde sentezlenir. Daha sonra üzüm tanelerine taşınan sakkaroz, burada invertaz enzimi yardımıyla kendisini oluşturan glikoz ve fruktoza ayrışır. İnvertaz aktivitesi çiçeklenmeden sonraki 6.haftada en yüksek seviyesine ulaşır. Tane gelişiminin başlangıcında glikoz miktarı daha fazla olmasına karşılık, hasat zamanında glikoz ve fruktoz oranı yaklaşık olarak birbirine eşit kabul edilir. Glikoz/fruktoz oranının çeşitlere göre 0,74-1,05 arasında değiştiği bulunmuştur.

Fruktoz; glikoz ve sakkarozdan daha tatlı bir maddedir. Yüzde 15’ lik fruktozun verdiği tadı ancak % 17,8’ lik sakkaroz veya % 22,8’ lik glikoz verebilmektedir. Erkenci çeşitler için fruktoz, orta ve geçici çeşitler için glikoz miktarı yüksek çeşitlerin seçilmesi önerilmiştir. Şeker miktarı tane tutumundan sonra hasada kadar düzenli olarak artar.

Olgun üzümelerde oldukça düşük miktarlarda (% 0,02-0,6) bulunan ancak, teknolojik olarak önemli olan polisakkaritler pektik maddelerdir. Üzümler preslendiğinde elde edilen şıra mat ve kolloidal bir görünüştedir. Şıranın berrak bir halde olmaması kısmen presleme sırasında şıraya geçen bazı maddelerden ileri gelirse de, mat görünüş şıradaki pektik maddelerden ileri gelir. Pektik maddeler şırada koruyucu kolloid görevi görerek diğer bulanıklık maddelerinin çökmesini de engellerler. Pektik maddelerin yapı taşları arabinoz, galaktoz, metil alkol ve galaktronik asittir. Henüz olgunlaşmamış üzümelerde pektin diğer meyvelerde olduğu gibi suda çözünmeyen protopektin halinde olup, meyve dokusunun sert olmasında etkili olur. Meyvede olgunluk başlayıp yavaş yavaş ilerledikçe protopektinazın etkisiyle protopektin suda çözünen pektin haline dönüşür. Aşırı olgun üzümelerde ise pektin pektinmetilesteraz etkisiyle pektik asite dönüşmektedir. Danenin olgunlaşması sırasında yavaş yavaş yumuşaması ve çekirdeği saran etli kısmın küçülmesinde bu değişikliğin rol oynadığı düşünülmektedir [12].

4.1.2.2 Asitler

Üzüm şırasında bulunan asitlerin başlıcaları: tartarik asit ve malik asit olmakla beraber, bu asitlerden başka şırada oldukça düşük düzeylerde sitrik asit, süksinik asit (olgunlaşmamış üzümelerde) ve okzalik asit bulunmaktadır. Şıradaki genel asit miktarı üzüm çeşidine, iklim koşullarına, toprak çeşidine, hastalık durumuna ve üzümün olgunluk düzeylerine göre değişiklik göstermektedir. Genellikle olgunlaşmış üzümelerde genel asit miktarı 3-15 g/L (tartarik asit olarak) düzeylerinde olmaktadır.

Meyveler arasında hemen hemen yalnız üzümde bulunan tartarik asit, üzümde kısmen serbest, kısmen de bağlı haldedir. Olgunlaşmamış üzümelerde daha çok serbest halde bulunurken tane büyüdükçe ve olgunluk ilerledikçe potasyumla birleşir ve olgunluk sırasında tartarik asidin büyük kısmı bağlı hale geçmiş olur. Olgunlaşmaya kadar gerek serbest ve gerekse bağlı kısımda miktar bakımından artış olmaktadır. Olgunlaşmış üzümelerde ise, yeniden asit meydana gelmemekle birlikte miktarı oldukça sabit kalmaktadır. Bundan dolayı ülkemiz üzümünde asidin büyük kısmını tartarik asit oluşturmaktadır. Tartarik asidin oluşturduğu tuzlarından en önemlisi; potasyumla olan potasyum tartarat tuzudur.

Şarap taşı ya da krem tartar adı da verilen bu tuz serbest karboksil grubuna sahip olduğundan ekşi bir tuz olup asit karakterindedir. Şarap taşının en önemli özelliği suda

az, alkolde çok az çözünmesidir. Tartarik asidin oluşturduğu diğer tuz ise nötr karakterli kalsiyum tartarattır. Kalsiyum tartaratın çözünürlüğü şarap taşından daha düşüktür.

Tartarik asidin bu her iki tuzu da kolaylıkla doymuş çözeltiler meydana getirirler. Bu özellik üzüm şıralarının konsantre edilmesi sırasında konsantrenin bulanmasına ve daha sonra da dipte kalın bir tortu oluşmasına neden olmaktadır.

Malik asit miktarı üzümlerin olgunlaşmaya başlamasına kadar tanede devamlı olarak artar ve miktarı litrede 15-20 grama kadar yükselir; ancak, tanelerin yumuşamaya başlamasıyla birlikte miktarı sürekli azalır ve aşırı olgun üzümlerde oldukça düşük miktarlara geriler. Malik asit miktarındaki bu azalma, solunum sonucunda malik asidin su ve karbondioksit parçalanmasından ileri gelmektedir. Malik asit de kısmen serbest kısmen de potasyum, kalsiyum ve magnezyum tuzları halinde bağlı olarak bulunur. Üzüm sırasında diğer organik asitlerden çok düşük miktarlarda sitrik asit (0,01-0,03g/100ml), özellikle olgunlaşmamış üzümlerde az miktarda süksinik asit ve çok az miktarda da okzalik asit (0,03-0,04 g/l) bulunur [12].

4.1.2.3 Mineral Maddeler (Kül)

Üzüm şırasındaki mineral maddelerin toplam miktarı 2-5g/L arasında değişmektedir. Üzüm şırasındaki kül miktarı üzerinde üzüm çeşidi, olgunluk derecesi, iklim koşulları ve yağışların vejetasyon devresindeki dağılışı, toprak cinsi ve gübreleme etkili olmaktadır. Kurak iklim bölgelerinde ve yıllarda köklerin topraktan mineral maddeleri alma imkanı daha az olacağından üzümlerde bulunan mineral maddelerin miktarı daha az olmaktadır. Şıradaki mineral maddelerin en büyük kısmını potasyum (15-25 mg/100ml) ile, kalsiyum (4-25 mg/100 ml) ve magnezyum (10-25 mg/100 ml) oluşturur.

Bunların yanı sıra sodyum (en çok 20 mg/100 ml), demir (en çok 3 mg/100 ml), sülfirik asit, az miktarda silikat asidi ile borik asidin tuzları bulunmaktadır [12].

4.1.2.4 Azotlu Maddeler

Üzüm tanesinde bulunan azotlu maddeler, tanenin doku hücrelerinde eşit miktarda dağılmış değildir. En çok kabuk hücrelerinde dışa doğru üçüncü ve dördüncü sıralarda bulunurken tanenin iç kısmına doğru miktarı gittikçe artar. Bu sebeple üzümlerin sıkılması sırasında kendiliğinden akan şıradaki azotlu madde miktarıyla, birinci ve

ikinci pres şıralarındaki miktarlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak sırada bulunan azotlu maddelerin miktarı (N) litrede 0,10-2,0 gram arasında değişmekle birlikte genellikle bu miktar 0,6 g/L civarındadır. Üzüm sırasında bulunan azotlu maddeler kısmen protein (albumin), kısmen de proteinin parçalanma ürünleri olan albümozlarla peptonlar ve amino asitler (prolin, arjinin, glutamik asit, serin, treonin vd.)’den ibarettir. Üzümde bulunan az miktardaki azotlu maddeler, beslenme fizyolojisi açısından dikkate değer miktarda olmamalarına rağmen, işleme teknolojisi açısından oldukça önemli bileşiklerdir. Nitekim serbest amino asitlerin başlıca rol oynadığı enzimatik olmayan esmerleşme (Maillard) reaksiyonlarının, meyve ve sebzelerin işlenmelerinde karşılaşılan sorunlar içinde önemli bir yeri vardır [12].

4.1.2.5 Renk Maddeleri

Meyve ve sebzelerin rengi, farklı nitelikteki renk maddelerinden, yani “pigmentler”den kaynaklanmaktadır. Beyaz üzümlerde yeşil rengi “klorofil”, sarı rengi ise karotenoid (karoten, ksantofil, quersetin ve quersitrin) grubu maddeler vermektedir.

Birçok meyve ham haldeyken fazla miktarda klorofil içerir ve bu yüzden renkleri yeşildir. Ancak olgunlaşma ilerledikçe klorofil yavaş yavaş kaybolur, sarı-kırmızı renkli karotenoidler hakim olur. Klorofil dayanıklı bir pigment değildir. Bu bakımdan meyve ve sebzelerin işlenmelerinde rengin kaybedilmesi ve böylece sarı veya kirli zeytin yeşili bir renk oluşması daima bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Klorofil molekülünde bulunan Mg, asitlerin etkisiyle molekülden kolaylıkla ayrılır ve yerine hidrojen bağlanarak “feofitinler” oluşur.

Karotenoidler meyve ve sebzelerin işlenmelerinde uygulanan genel işlemlere oldukça dayanıklıdır. Isıl işlemler sırasında herhangi bir parçalanma olmadığı gibi, işlenmiş meyve ve sebzelerin depolanmalarında da stabil kalırlar [12].

4.1.2.6 Fenolik Maddeler

Üzümde fenolik maddeler salkımın çöp ve saplarında, tanenin kabuk ve çekirdeklerinde bulunmaktadır. Başlangıçta tanenin et kısmında bulunmasına rağmen tanede büyüme ilerledikçe miktarı yavaş yavaş azalır. Olgunlaşmış üzüm tanelerinin et kısmında fenolik maddeler bulunmaz. Üzümlerin preslenmesi sırasında uygulanan basıncın şiddeti ve sıranın sap, çöp, kabuk ve çekirdeklerle temas süresi şıraya geçen fenolik maddelerin miktarını belirleyen faktörlerdir. Meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarda

bulunan fenolik maddeler, bunların işlenmelerinde değişik sorunlara neden olabilen önemli maddeler grubundan birisidir.

Fenolik maddelerin bir kısmı bu ürünlerin lezzetinde, özellikle ağızda buruk bir izlenim bırakma yönünde etkilidir. Diğer taraftan fenolik maddelerin bir kısmı renkli olduklarından, meyve ve sebzelerin renkleri üzerinde etkilidirler. Tüm bunlara ilaveten fenolik maddeler, fenoloksidazların etkisiyle enzimatik renk esmerleşmelerine neden olan önemli bir madde grubudur. Meyve ve sebze işleme teknolojisi açısından önemleri bu özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

Salkımın değişik kısımlarında bulunan fenolik maddelerin miktarları değişik olup, taze üzümlerin kabuklarında ortalama % 1,2, çekirdeklerinde % 2-9, yeşil sap ve çöplerde ise % 5 kadardır [12].

4.1.2.7 Lipidler

Üzüm şirasındaki yağ benzeri maddelerin (lipidlerin) miktarı çok düşük düzeydedir (0,01 g/l). Mumsu yapıda olan bu yapılar suda çözünmediklerinden dolayı meyve suyuna geçmezler [12].

4.1.2.8 Aroma Maddeleri

Üzümde bulunan aroma maddeleri kaynaklarına göre; üzümün tipik özelliğinden kaynaklanan çeşit aroması ve üzümün şıraya işlenmesi sırasında uygulanan teknolojik işlemlerden (ezme, çöp ayırma, kabuk maserasyonu, sıkma, ısıtma gibi) kaynaklanan aroma olarak iki grupta toplanabilir.

Çeşit aromasını belirleyen temel faktör üzüm çeşididir. Bunun yanında toprak, iklim, yetiştirme tekniği (budama, bakım, gübreleme, sulama), üzümün olgunluk durumu gibi diğer faktörler de çeşit aromasında etkili olurlar.

Üzümlerde bulunan aroma maddeleri iki farklı yapıda bulunur:

- Uçucu ve koku veren özellikte serbest aroma maddeleri ve
- Uçucu olmayan ve kokusuz özellikte, bazı bileşiklerin (glikozid, karoten, fenolik asitler, amino asitler) yapısında yer alan öncül aroma (precursor) ya da bağlı aroma maddeleri.

Üzüm tanesinde aroma maddelerinin genellikle katı kısımlarda ve özellikle kabuklarda yoğunlaştığı belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalarda üzümde olgunlaşma süresince serbest ve bağlı aroma maddelerinde bir artış olduğunu, serbest haldeki terpenol miktarının olgunluk anında en yüksek değere ulaştığını ve bağlı yapıdaki terpenollerin ise olgunluk aşamasından sonrada artmaya devam ettiği saptanmıştır.

Üzümde bulunan aroma maddelerinin önemli bir kısmı bazı bileşiklerin yapısında bağlı olarak bulunur. Bu özelliklerinden dolayı bağlı aroma maddeleri koku vermezler ve uçucu değildirler [12].

4.1.2.9 Enzimler

Enzimler bitkisel ve hayvansal dokuların bileşiminde yer alan, eser miktarda bulunan; ancak çok önemli rolleri olan organik katalizörlerdir. Meyvelerde bulunan enzimler meyvelerin işlenmesinde önemli bir rol oynarlar ve substrat olarak ortamda bulunan meyvedeki maddeleri parçalar ya da sentezlerler. Enzimatik reaksiyonların oluşması bazı gıdalarda istenilen değişikliklere neden olurken genellikle meyve işleme endüstrisinde istenilmeyen değişikliklere neden olurlar.

Üzümde hidrolazlar ve oksidazlar olmak üzere iki grup enzimin etkinliği önem taşımaktadır. Üzümde bulunan endojen proteazlar şırada bulunan çözünmez proteinleri hidroliz ederek suda çözünebilir hale getirme özelliğindedir. Bu enzimler iki amino asit arasındaki peptid bağının hidrolizini katalizler. Üzümde bulunan proteazlar asidik özellikte olup optimum çalışma pH'sı 2,0 civarında olduğundan şıra pH'sında aktivitelerinin % 40-60'ını gösterebilmektedirler. Kaynağı ne olursa olsun proteazlar termostabil özelliğe sahiptirler.

İşlemler sırasında üzümün hücresel yapısının parçalanması, enzimatik oksidasyon olaylarının oluşmasına yol açmaktadır. Ortamda oksijen tüketimi şıranın orijinine bağlı olarak 0,5-5 mg/L/dakika arasında değişmektedir. Bu değişim büyük çoğunlukla fenolik maddelerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Olgun üzümlerde kresolaz, katesoloksidaz ve tirosinaz olarak bilinen ortofenol oksijen oksidoredüktazlar bulunmaktadır.

Aktiviteleri asma çeşidine bağlı olarak oldukça değişkendir. Beyaz üzüm şırasında enzimatik aktivite sonucunda öncelikli olarak üzüm pulpundaki temel fenolik bileşiklerden olan hidroksisinnamik asitlerin tartarat türevleri okside olurlar. Bu reaksiyon sonucunda stabil olmayan kinonlar oluşur ve takiben benzer olarak farklı iki reaksiyon meydana gelir. İlk olarak reaktif olan kinonlar diğer fenolik bileşiklere

(flavanoidler) kondense olarak polimerleşme ürünleri oluştururlar. Bu ürünlerin rengi kondensasyon derecesine bağlı olarak, sarıdan kahverengiye kadar değişmektedir.

Kinonlar, glutathion gibi kuvvetli indirgen moleküllerle reaksiyona girme yeteneğindedirler. Bu reaksiyon sonucunda renksiz bileşikler meydana gelmektedir. Bu ürünler tirozinaz tarafından okside edilemediklerinden dolayı şıra renginde değişiklik olmamaktadır.

Şıranın esmerleşmesi, flavonoid konsantrasyonuna ve çoğunlukla üzümün salkım halinde maserasyonuna ve mekaniksel işlemlere bağlıdır. Üzümde bulunan tirozinazaktif olmakla birlikte şıra pH'ında stabil değildir. 50 °C sıcaklıklara çıkılması ya da 50 mg/Lden fazla SO₂ ilavesi, enzim aktivitesini sona erdirmektedir [12].

4.1.2.10 Vitaminler

Üzüm tanesinin yenilebilen kısımlarında; 1-18 mg/100g askorbik asit (C vitamini), 10-100 µg/100g β-karoten, 10-70 µg/100g B1 vitamini (tiyamin), 100-300 µg/100g niasin, 20-60 µg/100g riboflavin bulunmaktadır [12].

4.2 Pekmez

Pekmez ülkemizde üretilen geleneksel bir gıda maddesidir. Pekmez yaygın olarak taze üzüm ve ihraç şansı olmayan kuru üzümünden üretilmekle birlikte elma, dut, kayısı, erik, karpuz, incir ve şeker pancarından da pekmez üretilmektedir. Pekmez genel olarak meyve şırasının asitliğini gidermeden veya giderdikten sonra açık yada vakum kazanlarda koyulaştırılarak elde edilen bir ürün olup, üretim aşamaları hammaddeye ve yöreye göre değişiklik göstermektedir. Fakat ülkemizde en yaygın üretilen ve tüketilen pekmez türleri üzüm ve dut pekmezleridir. Pekmez yüksek miktarda şeker, mineral ve organik asit ihtiva eden bir üründür. Bundan dolayı da insan beslenmesi açısından çok önemli bir gıdadır [21].

Ülkemizde pekmez üretimi çok eskilere dayanmaktadır. Pekmez, Osmanlı İmparatorluğu zamanında Mısır çarşısında soğuk algınlığı, göğüs nezlesi ve boğaz ağrısı için ilaç olarak kırmızı acı biber ile beraber kullanılmaktaydı. Memluklar devrinde de içki çeşidi olarak pekmez tüketildiği Memluklar devrinde yazılan Türkçe eserlere de yansımıştır. Pekmez ile ilgili Türkçe yazılı literatür ancak 1940'lı yıllarda yazılmaya başlanmıştır. 1940 yılında “üzüm pekmezleri üzerine teknik araştırmalar” başlıklı bir

araştırma yapılarak geleneksel pekmez üretim yöntemleri belirtilmiş ve farklı bölgelerden sağlanmış olan pekmez örneklerinin bileşimleri araştırılmıştır. 1940'lı yıllardan sonra şeker darısı, şeker pancarı, karpuz ve üzüm pekmezleri üzerine yapılmış olan bazı araştırmalar vardır. Daha sonra Turgut Yazıcıoğlu'nun yapmış olduğu araştırmalar 1976'ya kadar devam etmiştir. 1980 yılının başlarında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesinde "üzüm şirasının pekmeze işlenmesi sırasında oluşan terkip değişimleri üzerine bir çalışma" yapılarak bu çalışma 1982 yılında yayınlanmıştır. Ayrıca 1976-1984 yılları arasında Gebze, Tübitak Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsünde Gökçen, Ömeroğlu ve Yazıcıoğlu' nun pekmez üzerine yapmış oldukları bazı çalışmalar yayınlanmıştır. 1990' nın başında Batu ve Yurdagel Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde kuru üzümünden beyaz katı üzüm pekmezi üzerinde bazı araştırmalar yapmışlardır. Bu çalışmada, kuru üzüm şirasında oluşan kolloidlerin durultulması, durultulmuş şiranın açık kazan ve vakum kazanında konsantrasyonu sırasında oluşan kimyasal değişimler ve ayrıca sıvı pekmezin ağartılması ve katılaştırılması üzerine farklı araştırmalar yapılmıştır. Bunlara ek olarak son yıllarda Çukurova, Selçuk ve Gaziantep Üniversitelerinde pekmez üzerine bazı araştırmalar devam etmektedir [21].

4.2.1 Pekmez Üretimi

Türkiye'de pekmez çok eski zamanlardan beri büyük miktarlarda üretildiği halde üretim tekniği çok fazla değişmemiştir. Farklı özelliklerde olan pekmezlerin üretiminde bir takım farklılıklar vardır. Bu farklılıklarda dikkate alınarak değişik pekmezlerin üretim aşamaları şu şekilde özetlenebilir.

4.2.2 Sıvı Pekmez Yapımı

Sıvı pekmezler şiranın asitliğinin giderilip giderilmemesine göre; tatlı ve ekşi sıvı pekmez olmak üzere iki tipe ayrılır.

4.2.2.1 Tatlı Sıvı Pekmez Yapımı

Pekmez yapılacak hammaddeler üzerlerindeki toz, toprak ve sap parçacıkları ile tarımsal ilaç kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkanılır. Pekmez üretiminde mikroorganizmaların hammadde de en az düzeyde bulunması istenir. Temizlenen ürünlerden şıra eldesi insan gücü kullanılarak gerçekleştirilir. Ürünler çuvallara

doldurularak tahtadan veya betondan yapılmış teknelerde ayakla çiğnenerek şıraları çıkarılır. Elde edilen şıra bulanık ve asit karakterlidir. Örneğin, üzüm şırasındaki asitliği başta tartarik asit olmak üzere malik asit ve az miktarda da sitrik asit oluşturur. Ortalama olarak litrede 5 g olan bu asitlerin tatlı pekmez üretebilmek için belirli düzeyin altına indirilmesi gerekir. Asit giderici olarak çeşitli yörelerde, değişik bileşim gösteren ve pekmez toprağı denilen toprak kullanılmaktadır. Kireci fazla, rengi beyaz veya beyaza yakın topraklar bu amaçla kullanılmaktadır. Pekmez toprağı aynı zamanda durultmanın sağlanmasında da etkili olmaktadır. Kullanılacak toprak miktarı değişik olabilmektedir. Bu amaçla 100 kg taze üzüm şırasına 0,1-1,0 kg arası toprak veya 100 L şıranın asitliğini % 0,1 düzeyinde azaltmak için 66 g teknik kalsiyum karbonat, CaCO_3 ilave edilmelidir. Toprağın şıraya etkisini kolay ve çabuk sağlamak, mayaların faaliyetini önlemek ve durultmayı hızlandırmak için üzüm şırası kuvvetli yanan bir ocak üzerinde bir taşım kaynatılır ki buna şıranın kestirilmesi denir. Kestirme sonrasında şıra dinlenmeye bırakılır ve 5-6 saat sonra tortunun kabın dibine çöktüğü görülür. Uygulamada genellikle bir gece beklenerek işlem gerçekleştirilmektedir. Bu bekleme süresi sonunda berrak kısım tortudan ayrılır ve berrak şıra elde edilir. Elde edilen berrak şıranın koyulaştırma işlemi 15-18 cm derinliğinde ve 70-80 cm çapındaki bakır hazırlama kaplarında yapılır. Berrak şıradan 45 L alınıp bakır hazırlama kabına aktarılır ve hazırlama kabı ocağın üzerine yerleştirilir. Şıra kaynarken devamlı karıştırılır ve savrulur. Böylece buharlaştırma işlemine yardımcı olunur ve kabın dibindeki yanıkların oluşması önlenir. Karıştırma sırasında şıra yüzeyinde oluşan kirli köpükler alınır. Koyulaştırmanın yeterliliği pratik olarak, koyulaşan pekmezden tahta kaşıkla alınan örneğin yavaşça akıtılması ile damlaların bir noktadan değil de yan yana iki yerden damlaması ile anlaşılır. Koyulaştırma işlemi, güneşi bol ve kurak bölgelerde güneş enerjisinden yararlanılarak da yapılır. Şıra tepsilere konur ve güneşte bekletilerek koyulaştırılır. Bu şekilde yapılan pekmeze “günbalı” veya “gün pekmezi” denir ve pekmezler içinde en kaliteli olanıdır. Pekmez, cam kavanoz, plastik bidon veya diğer ambalajlara doldurularak muhafaza edilir.

Modern yöntemle tatlı sıvı pekmez üretimi kuru üzümünden pekmez yapılacaksa kuru üzümler öncelikle nemlendirilir ve kıyma makinesinden geçirilir. Kıyılmış olan kuru üzümlere ters akım prensibine göre (1:3, katı : sıvı ekstraksiyonu) özütleme işlemi uygulanır. Taze üzümlerden üretim yapılacaksa öncelikle üzümler yıkanarak temizlenirler. Temizlenen üzümler, sap ayırma makinesinden geçirilerek saplarından

ayrılır. Danelenen üzümler, üzüm ezme değirmeninden geçirilerek ezilirler. Böylece üzümler, preslenmeye hazır hale gelirler. Şıranın elde edilmesi için üzümler prestan (pnömatik, horizontal, paketli) geçirilirler. Presleme sonucu elde edilen şıraya renk kararmalarını önlemek amacıyla 50 ppm düzeyinde kükürt dioksit, SO₂ ilave edilebilir. Presleme sonucu elde edilen şıra bulanık ve asit karakterlidir. Bulanıklığın derecesi ve niteliği çeşide, taze veya bekletilmiş oluşuna göre değişmektedir. Modern işletmelerde şıra, kaba maddelerinden ayırmak amacıyla separatörden geçirilir. Separasyon işleminden sonra şıraya asitliğini gidermek amacıyla pekmez toprağı ilave edilir. Bu amaçla 100 L şıranın asitliğini % 0,1 düzeyinde azaltmak için 66 g teknik CaCO₃ ilave edilir. Toprağın şıraya etkisini kolay ve çabuk sağlamak, mayaların faaliyetini önlemek ve durultmayı hızlandırmak için şıra 70°C' ye kadar ısıtılır. Şıra soğutulur ve dinlenmeye bırakılır. 5-6 saat sonra tortunun kabın dibine çöktüğü görülür. Bu bekleme sonunda berrak kısım tortudan ayrılır. Şıranın tamamen berraklaştırılabilmesi ve buruk tatların ortadan kaldırılabilmesi için şıraya durultma işlemi uygulanır. Durultma işlemi ısı uygulamak suretiyle, tanen-jelatin uygulaması veya enzimatik yolla sağlanabilir. Yeterli bir durultma için, % 41 kuru maddeli şıraya 10 g/hl, % 17 kuru maddeli şıraya ise 5 g/hl tanen ve jelatin ilave edilmesi yeterli olmaktadır. Durultma sonunda şıra filtre edilerek berrak şıra elde edilir. Berrak şıra açık kazan ya da vakum yöntemine göre suyu buharlaştırılarak koyulaştırılmaktadır. Açık kazanda yüksek sıcaklıklarda konsantrasyon işleminde pekmezdeki şekerin % 5-10 kadarının yanarak karamelize olup esmer renkli, tat ve kokusu bozuk olan bir ürün oluşmaktadır. Pekmezin böyle esmer renk alması şıranın bileşiminde bulunan indirgen şekerlerin ısıl işlem sonucunda asitlerin ve diğer kimi maddelerin etkisiyle tepkimeye girmesi sonucu oluşmaktadır.

Isıl işlem uygulaması ile koyulaştırılan gıda maddelerinde önemli bir kalite faktörü de hidroksimetilfurfural, HMF'dir. Açık kazan yönteminde asitlik değerinin yükselmesi durumunda konsantrasyon işlemi süresince ortamda bulunan indirgen şekerlerin ortamın pH derecesi düşükçe HMF üzerinden formik asit ve levulin aside kadar parçalandığı belirtilmektedir. Vakumda konsantrasyon işlemiyle uygun renk, tat ve kokuda, karamelize olmamış pekmez üretilmektedir. Vakum yöntemiyle üretilen pekmezin HMF içeriğı 32,25 mg/kg gibi düşük düzeyde olup, açık kazan yöntemiyle üretilen pekmezde bu değer yasal sınır olan 150 mg/kg'ın çok üzerinde olmaktadır. İstenilen kurumadde düzeyine ulaşılnca konsantrasyon işlemine son verilir ve pekmez soğumaya bırakılır. Pekmez, insan sağlığına zarar vermeyecek ve pekmezin özelliklerini

bozmayacak nitelikteki laklı teneke kutu, cam kavanoz plastik veya diğer ambalajlara doldurularak piyasaya arz edilir [21].

4.2.2.2 Ekşi Sıvı Pekmez Yapımı

Hasat edilen üzümler, üzerlerindeki toz, toprak ve sap parçacıkları ile tarımsal ilaç kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkanılır. Pekmez üretiminde mikroorganizmaların hammaddede en az düzeyde bulunması istenir. Temizlenen üzümlerden şıra eldesi insan gücü kullanılarak gerçekleştirilir. Elde edilen şıra bulanık ve asit karakterlidir. Ekşi pekmez yapımında elde edilen şıra asit giderme işlemi uygulanmadan koyulaştırma işlemine tabi tutulur. Koyulaştırma işlemi 15-18 cm derinliğinde ve 70-80 cm çapındaki bakır hazırlama kaplarında yapılır. Elde edilen şıradan 45 L alınıp bakır hazırlama kabına aktarılır ve hazırlama kabı ocağın üzerine yerleştirilir. Şıra kaynarken devamlı karıştırılır ve sivrulür. Böylece buharlaştırma işlemine yardımcı olunur ve kabın dibinde yanıkların oluşması önlenir.

Karıştırma sırasında şıra yüzeyinde oluşan kirli köpükler alınır. Koyulaştırmanın yeterliliği pratik olarak, koyulaşan pekmezden tahta kaşıkla alınan örneğin yavaşça akıtılması ile damlaların bir noktadan değil de yan yana iki yerden damlaması ile anlaşılır.

İstenilen koyuluğa ulaşan pekmez ocaktan indirilir ve soğumaya bırakılır. Pekmez, cam kavanoz, plastik bidon veya diğer ambalajlara doldurularak muhafaza edilir.

4.2.3 Katı Pekmez Yapımı

Katı pekmezler bir kaptan diğerine ancak bir kaşık, hatta bıçakla alınabilecek özelliktedir. Ayrıca katı pekmezlerin renkleri de çok değişiktir. Bazıları kahverengi, bazıları sarı ve bir kısmı da beyaz denecek kadar açık renkli olurlar. Katı pekmez yapımı çok dikkat isteyen ve gerçekten hüner gerektiren bir iştir. Ülkemizde katı pekmez yapma yöntemleri bölgelere göre farklılık gösterir [21].

KROMATOGRAFI

Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır. Yüzlerce maddenin karışımı bile kromatografi yöntemiyle analiz edilebilir. Kromatografi terimi ilk olarak Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında kullanılmıştır. Daha sonraları analitik çalışmaların birçoğunda kromatografi yer almıştır [22].

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz, katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş ve hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler.

Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareketi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengelerin dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır [23]. İyonik etkileşimler,

- a) İyonlar arasındaki Coulomb çekim kuvvetleri
- b) İyon-indirgenmiş iyon etkileşimleri
- c) Dipol-dipol etkileşimleri
- d) Dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri
- e) Nötral atom ya da moleküller arası kuvvetlerdir (London kuvvetleri).

Ayrıca en iyi koşulların sağlanabilmesi için, sabit faz yapısı, hareketli faz bileşimi ve sıcaklığın dağılıma etkisi de ayarlanabilir.

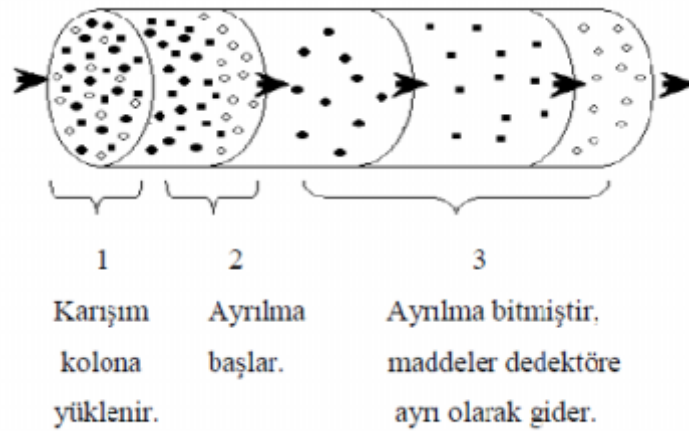
Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adını taşıyan ve Kromatografik kolondaki ayırma olaylarını matematiksel olarak tanımlayan bir eşitlik bulmuştur [23].

$$H = A + B/u + C \quad (5.1)$$

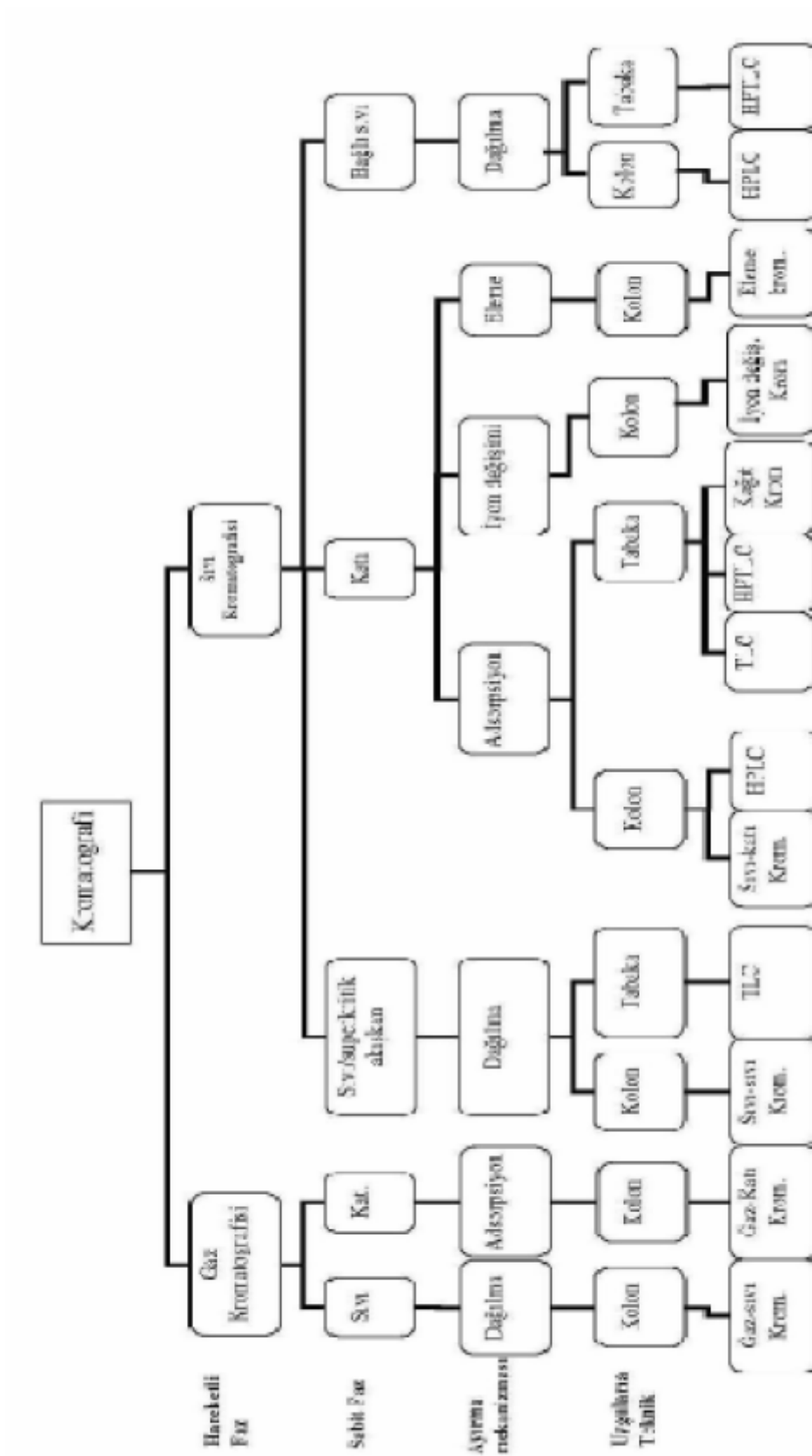
Eşitlik 5.1’de; H: Tabaka yüksekliği (cm), A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyon, B: Boyuna difüzyon, C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı, u: Çizgisel hız

Karışımında bulunan maddelerin kolon boyunca ayrılması ve hareketli faz akış hızıyla kolondan geçmesi Şekil 5.1’de gösterilmiştir.

Kromatografik sistem iki ana grupta toplanır; hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına bağlı olarak gaz ve sıvı/süperkritik akışkan kromatografisidir. Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına, sabit fazın katı ya da sıvı olmasına, kromatografik ayırmanın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre isimlendirilirler (Şekil 5.2) [23].



Şekil 5.1 Kromatografik ayırmanın şematik olarak gösterilmesi



Şekil 5.2 Kromatografik sistemin sınıflandırılması [24]

5.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografik yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lu yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilmesi oldukça duyarlı bir yöntemdir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır.

Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi, analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir [25].

5.1.1 HPLC Sistemleri

HPLC sistemi temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz işleminde örnek enjektör yardımı ile sisteme gönderilir. Örnek hareketli faz ile kolon boyunca geçer ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Kolon çıkışında ayrılan bileşenlerin sinyallerini dedektör kaydeder. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir. Şekil 4.3'de HPLC sistemi şematik olarak sunulmaktadır [25].



Şekil 5.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminin şematik gösterimi [26]

Kolon içerisinde mobil fazın devamlı olarak içinde aktığı, geniş yüzey alanına sahip hareketsiz dolgu materyaline sabit faz adı verilmektedir. Örnek bileşenlerini kolon boyunca taşıyan sıvı faza da hareketli (mobil) faz adı verilmektedir. Her bir HPLC

türünde kullanılan mobil fazların farklı özellikleri söz konusudur. İyon değişim, afinite ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde, farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltiler mobil faz olarak kullanılırken; normal faz sıvı kromatografisinde apolar, ters faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril gibi polar çözücü karışımları mobil faz olarak kullanılmaktadır. Kullanılan mobil fazın dedektör ile uyumlu, yüksek derecede saf, düşük vizikoziteli, kimyasal açıdan inert ve örneği çözebilecek kimyasal yapıda olması gerekmektedir [25].

5.1.2 HPLC Kullanım Alanları

HPLC sistemleri günümüzde birçok alanda kullanılırken başlıca kullanım alanları olarak ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayini sayılabilir.

Ayırma işleminde temel prensip, uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımının kolondan geçirilerek sabit faz ile etkileşimine dayalı olarak bileşenlerine ayrılmasıdır. Yapılan ayırma işleminin derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine göre değişiklik göstermektedir. Saflaştırma işlemi, saflaştırılmak istenen maddenin atıklardan veya diğer maddelerden ayrılmasıdır. Bu işlem yapılırken istenen madde kolon çıkışında toplanmakta ve diğer fraksiyonlar ortamdan izole edilmektedir. Saflaştırma yapabilmek için doğru mobil faz seçimi ve ayrılmak istenen maddenin kolondan çıkış süresinin istenmeyen maddelerin çıkış süresinden kısa olması gerekmektedir. HPLC sistemlerinde bilinmeyen maddelerin tanımlama işlemi de yapılabilmektedir. Bu işlem, tanımlanacak maddeye ait pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresi ile karşılaştırılması ile mümkün olabilmektedir. Doğru tanımlama için, tanımlamaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olması gerekmektedir. Tanımlı bir maddenin, HPLC kullanılarak derişim tayinini yapmak da mümkündür. Bu işlem için derişimi tespit edilmek istenen maddenin değişik derişimlerdeki çözeltileri sisteme enjekte edilmekte ve alınan seri piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilmektedir. Derişimi bilinmeyen maddenin verdiği pikin altında kalan alan hesaplanarak ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak derişimi tespit etmek mümkün olabilmektedir [25].

5.1.2.1 Normal Faz Kromatografisi

Polar sabit faz (örneğin silika jel) yüzeyi ile n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklerle oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir [25].

5.1.2.2 Ters Faz Kromatografisi

Apolar (hidrofobik) sabit faz yüzeyi ile metanol, su-asetonitril karışımı gibi polar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada en polar yapıdaki örnek bileşenleri sabit faz ile en az etkileşime girerek kolonu en hızlı şekilde terk eder. Daha apolar olanlar ise sabit faz ile arasındaki etkileşim şiddetine göre kolonu daha geç terk ederler [25].

5.2 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK basit, ucuz, hızlı, hassas, verimli ve miligram düzeyinde madde gerektirmesi açısından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

İTK gıda analizlerinde ve kalite kontrollerinde tüm dünya laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Gıdaların kompozisyonun belirlenmesi, katkı maddeleri ve hile yapılmak suretiyle ilave edilen birtakım maddelerin tespit edilmesi gibi İTK alanlarıyla ilgili çok sayıda uygulamalar yer almaktadır. Ayrıca birtakım tarımsal ürünler ve bitkiler, İTK kullanılarak analiz edilmektedir.

İTK, gaz kromatografisi (GC) ve HPLC birbirini tamamlayan yöntemler olmasına rağmen, İTK birçok analiz bazında; işlemin basitliği, birçok hassas ve seçici reaktif varlığı, aynı numune uygulaması üzerinde birtakım parametrelerin değiştirilerek analizin tekrarlanabilirliği, aynı anda çok sayıda numunenin aynı plaka üzerinde analizine olanak sağlamak suretiyle ve düşük miktarda çözücü kullanımı gibi avantajlara sahiptir [27]. Kısacası modern İTK, güçlü, güvenilir ve düşük maliyetli bir nitel ve nicel bir yöntemdir.

Kromatografi teorisi ayırma işlemini kontrol eden fizikokimyasal ilişkiyi tanımlar. Basit termodinamik temeller üzerine kurulu olan ve fiziksel ve kimyasal olguları kabaca resmeden kromatografik işlemin yarı deneysel modelleri genellikle karmaşıktır.

Kromatografik işlemlerin makroskobik modelleri de bu işleme ait olan mekanizmayı çoğunlukla yansıtamaz.

İTK basit temel olgularından biri kapiler akıştır. Hareketli fazın ince tabakaya transferi ancak kapiler kuvvetleri ile mümkündür. Çözücü veya çözücü karışımları katı fazda yer alan katı yatakların kapiler boşluklarına serbest yüzey alanlarını ve serbest enerjilerini azaltmak maksadıyla girerler. Kapilere giren bir çözücünün serbest-enerji kazanımı (5.2) eşitliği ile verilir:

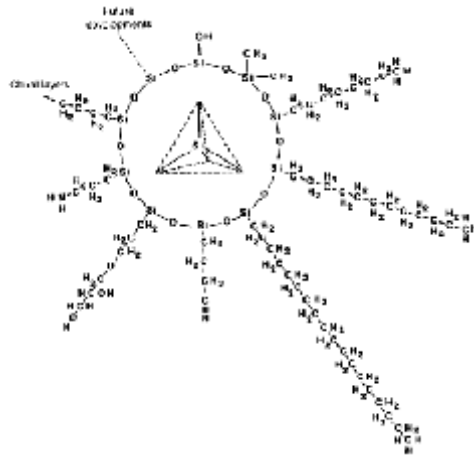
$$\Delta Em = -2\gamma V_n/r \quad (5.2)$$

Eşitlikte γ : serbest yüzey gerilimini, V_n : çözücünün molar hacmini ve r : kapiler yarıçapını göstermektedir.

Eşitlikten de görüleceği üzere kapiler yarıçapı r kapiler akışı için çok önemlidir ve çap ne kadar küçülürse akışta o kadar etkili olur.

İTK'nin diğer olgularından birisi de, kolon kromatografisinden farklı olarak, ince tabakanın katı yatak mikroporlarının kromatografik çözücü tankında yer alan çözücünün buharına maruz kalmasıdır. Bu yüzden hareketli fazın, sıvı ve gaz formlarının termodinamik dengeye ulaşması için bir takım ön hazırlıkların yapılması gerekmektedir. [28].

Laboratuarlarda rutin olarak yer alan ayırma yöntemleri çeşitli kromatografik ve elektrofetik teknikler içermektedir. Bu tekniklerin seçiciliği yeni adsorbanların kullanıma sunulmasıyla-örneğin kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeylerin-her geçen gün arttırılmaktadır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 Yaygın olarak kullanılan yüzeyi modifiye edilmiş silika gel plakaların şematik gösterimi [29]

İTK plakaları, firmalar tarafından cam, plastik ya da alüminyum plakalara hazır kaplanmış olarak satılabildikleri gibi laboratuarda da kaplanabilmektedirler. Hazır kaplanmış plakalar genellikle 0,1 mm kalınlığında adsorban içerirler. Plastik ve alüminyum plakalar makasla istenen boyutlara rahatlıkla kesilebilmektedirler. Alüminyum plakalar, spotların görünür hale getirilmesi sırasında ısıdan etkilenmezler. Daha kalın kaplanmış ve büyük olan plakalar preparatif ince tabaka kromatografisinde 50-1000 mg madde karışımlarının birbirinden ayrılması için kullanılır [30].

5.2.1 Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (YPİTK)

YPİTK bilinen İTK'den farklı daha küçük parçacık çaplarına sahip taneciklerden (İTK'de 12-20 µm iken YPİTK'de 5 µm) oluşan bir tabaka üzerinde gerçekleşen etkili bir nitel ve nicel analiz yöntemidir. Parçacık boyutu dağılımının daha dar, yüzeyin daha ince olması ve yürütme uzaklığının daha kısa olması YPİTK'nin daha hızlı ve etkili bir ayırım yapmasını ve tespit edilebilir madde miktarının iyileştirilmesini sağlamaktadır. Son 20 yılın literatür verilerine bakıldığında gıda ve beslenme analizleri alanında yaklaşık 600 adet YPİTK ve İTK yayını yer almaktadır. Verilerde ilgi çekici olan bu yayınların sadece % 10'nunda Yüksek-Performanslı İTK'nin kullanılmış olmasıdır. Bu da göstermektedir ki yapılan analizlerin birçoğu tarama basamağında kalmış ve nicel analizlerde kullanılmamıştır. YPİTK kullanmak yerine, nicel analizlerde ilaveten HPLC kullanılması hem ekstra zaman harcanmasına hem de maliyet artışına sebep olmaktadır [31].

Enstrümantal YPİTK, plakaya manuel olarak yapılan işlemleri en az düzeye indiren, numunedeki bileşenleri nanogram hassasiyetinde ve bağıl standart sapmayı % 1 dolaylarında tespit eden bir metottur [32].

YPİTK cihazı tek bir yazılım ile bilgisayardan kontrol edilebilen farklı cihazlardan oluşur. ATS4 otomatik olarak plakaya en fazla 72 örnek uygulayabilen otomatik enjeksiyon sistemine sahip olan örnekleyicidir. Viallerdeki numunelerin plakaya önceden verilen bant sayısına uygun genişlikte ve seçilen x-y düzlemi mesafesine göre azot gazı altında tatbik edilmesini sağlar. Daha sonra plaka yürütme tankına numune bileşenlerine ayrılсын diye bırakılır. İki çeşit yürütme tankı vardır; izokratik ve gradient. İzokratik tank ünitesi (ADC2), geleneksel İTK'deki kapalı tank sistemi gibidir. Bu otomatik cihazla tank içindeki sıcaklık, nem, kurutma ve doygunluk kontrolü sağlanmaktadır. ADC2 ünitesi bölmeye yerleştirilen plakayı otomatik olarak tanka

indirerek, mobil faz ile plakanın bileşenlerinin yürütülmesini ve ardından plakanın otomatik olarak kurutulmasını sağlar. Daha sonra plaka değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine (İTK Scanner3) yerleştirilir. Densitometre, plaka üzerine gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin, miktarına ilişkin bilgi elde etmeye olanak vermektedir. Lekelerin yerlerinin uygulama noktasına uzaklığının, tüm analiz mesafenin uzunluğuna oranından lekenin bu sistemdeki alıkonma değeri olan R_f hesaplanır [30].

5.2.2 Kromatogramın Tanımlanması ve Görselleştirilmesi

Kromatogramın yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, çoğunlukla maddeler görünür bölgede aktif olmadıklarından kromatografik bölgeye birtakım görselleştirme işlemlerinin yapılması gerekir. Bazı maddeler UV ışığı absorbe ederken, bazılarına uygun türevleyici ajanların, plakaya püskürtülmesi veya plakanın bu çözeltilere daldırılması suretiyle uygulanması gerekir. İTK’de yaygın olarak kullanılan sorbentlerin kimyasal reaksiyonlara karşı ilgisizliğinden dolayı, birtakım kimyasal reaksiyonlar plaka sorbentine zarar vermeden gerçekleştirilebilir. Bu amaçla kullanılan teknikler şu şekilde sınıflandırılır [32]:

I. Yıkıcı Olmayan Teknikler (Fiziksel Metotlar)

- Elektromagnetik Işımanın Görünür Bölgesinde tanımlama
- Elektromagnetik Işımanın UV Bölgesinde tanımlama

1) Tersinir Reaksiyonlar

- İyot Buharı
- Amonyak Buharı

2) Tersinir Olmayan Reaksiyonlar

- Floresans Boyalar
- pH İndikatörleri

II. Yıkıcı Teknikler (Kimyasal Metotlar)

- Karbonlaştırıcı Reaksiyonlar
- Termokimyasal Aktivite

Türevlendirme Reaksiyonları

- Yürütme işlemi Sonrası Görselleştirme
 - Üniversal Kimyasal Reaktifler
 - Fonksiyonel Gruplara Özel Reaktifler
 - Ardışık Görselleştirme Reaksiyonları
- Yürütme işlemi Öncesi Görselleştir

İZOTOPIK ANALİZ

6.1 Gıda Ürünleride Orjinallik (Authenticity) Tayini

Authenticity (Orjinallik) Codex Alimentarius’da gıda ürünlerinin fiziksel, kimyasal, organoleptik ve esansiyel besinsel karakteristiklerinin değişmeden kalması şeklinde tanımlanmaktadır. Gıda ürünlerinin orijinallliği üretici, tüketici ve kontrol organlarınca önemli bir konu arz etmektedir. Gıdaların tadını, kokusunu ve rengi gibi karakteristik özellikleri değiştirmek adına birtakım değişik katkıları ilave edilir ki, bu ilavelerden bazıları ürünün kalitesini resmeder. İlavelerin çoğu bazı yönetmeliklerle belirlenmekte, ayrıca yapılan ilavelerin açık bir şekilde beyanı zorunlu olmaktadır. Beyan edilmeksizin yapılan hileli ilavelerin tespiti ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır [33].

Bitki ve hayvansal organizmalardaki moleküllerin izotopik içerikleri ve dağılımları çevresel faktörlerden ve sentez yollarından etkilenmektedir ki, bu sebeple bu özellik kimyasal olarak aynı yapıya sahip fakat farklı kaynaklardan sentezlenen moleküllerin kökeni (kaynağı) hakkında bilgi vermektedir. Kimyasal bir türün “yapay (sentetik)” veya “doğal” olduğunu belirleyen yöntemler izotopik analiz temeli üzerine kurulmuştur.

Örneğin her bitki coğrafik faktörlerden ve metabolizmatik sentezlerden dolayı kendine özgü bir döteryum dağılımına sahiptir. Doğada döteryum su içerisinde ortalama 150 ppm dolaylarındadır. Ancak bu dağılım yerkürede aynı oranda olmayıp, ekvatorda en yüksek değerlerde iken kutuplarda 70 ppm’e kadar düşmektedir.

Bitkiler çevresinden bünyesine aldığı suyu metabolizmatik aktivitelerinde kullanarak şeker, protein ve diğer ürünlere dönüştürür. Her bitki kendine özgü biogenetik yolla metabolizmasındaki kimyasalları üretir, dolayısıyla aynı cins iki bitki kendine özgü yapısından ötürü moleküllerinde kendine has döteryum dağılımına sahiptir [33].

6.2 Kararlı İzotopların Analizi

Son 30 yıldan bu yana kararlı izotopların (radyoaktif olmayan izotopların) ölçülmesi gıda sanayinde sahteciliğe karşı güvenli bir araç olduğunu göstermiştir. Birçok izotopik analiz gerek Avrupa’da gerekse de Kuzey Amerika’da gıdaların orijinalliğinin tespiti için resmi veya standart metot olmuştur. Bu metotlar bir ürünün veya bir ürünün içerisinde önem arzeden bir maddenin kararlı izotoplarının (^2H , ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N vb.) ölçülmesi ilkesine dayanır (Çizelge 6.1) [34].

Çizelge 6.1 Birtakım kararlı izotoplar, doğal bollukları ve referans maddeleri [34].

Element	İzotop	Göreceli Doğal Bolluk (%)	Uluslararası referans ve onun izotopik oranı (R)
Hidrojen	^1H	99,9895	V-SMOW(H_2O)
	$^2\text{H}(\text{D})$	0,0145	$^2\text{H}/^1\text{H}=1,5576 \times 10^{-4}$
Karbon	^{12}C	98,892	V-PDB ^a (CaCO_3)
	^{13}C	1,108	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=1,1237 \times 10^{-2}$
Azot	^{14}N	99,6337	AIR(Atmosferik azot- N_2)
	^{15}N	0,3663	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}=3,6765 \times 10^{-3}$
Oksijen	^{16}O	99,7587	V-SMOW(H_2O)veya V-PDB
	^{17}O	0,0375	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}=2,0052-2,0672 \times 10^{-3}$
	^{18}O	0,2039	

Kararlı izotop analizleri gıdalarda yapılan hilenin tespiti için en etkili yöntemdir. Bu metotlar bir ürün içindeki veya dolaylı yollarla elde edilen kararlı izotopların ölçümüne dayanır. Kararlı izotop ölçümlerinde iki teknik kullanılır ve bu teknikler şöyledir:

- Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR)
- İzotop Oranı-Kütle Spektroskopisi (IRMS)

NMR veya IRMS kullanımı ile yapılan bu tespitler botanik ve coğrafik köken hakkında bilgiler verir ki, bu veriler tüketiciler veya ulusal ve uluslararası yönetmelikler tarafından çok önemli karakteristik özellikler olarak düşünülür. Bununla beraber, şunun altı çizilmelidir ki, sadece bir elementin veya o elementin sadece bir bölümüne ait veriler yerine çoklu izotopik analizler ve veriler gıdaların orijini ve orijinliliği hakkında güvenilir bilgiler adına gereklidir.

Numune bünyesinde yer alan şekerlerle, sonradan dışarıdan ilave edilen mısır, şeker kamışı sakkarozu, glukoz ve fruktoz şurubu ve invert şekeri gibi şekerleri farklıdırabilmektedir.

6.3 Hidrojen ve Oksijen: Doğal İzotopik Fraksiyonlaşma

Tabiatıta suyun hidrolojik çevriminin önemli bir unsurunu teşkil eden buharlaşma, yeryüzünde sıvı ve katı halde değişik şekil ve şartlarda bulunan suyun meteorolojik faktörler etkisiyle atmosfere gaz halinde dönüşü olarak tarif edilir. Yeryüzünde suyu ihtiva eden her yüzey, atmosferdeki su buharının kaynağıdır. Denizler, göller, akarsular, nemli topraklar, karla örtülü veya buzla kaplı yüzeyler, ormanlar, bitki örtüsüne sahip araziler üzerinde devamlı buharlaşma meydana gelmektedir.

Su yüzeyinde meydana gelen su kayıplarına buharlaşma (evaporasyon), bitkilerden meydana gelen su kaybına terleme (transpirasyon) denir. Bitkilerden ve civarındaki topraktan meydana gelen su kaybına ise evapotranspirasyon adı verilir.

6.3.1 Buharlaşmaya Etki Eden Faktörler

Su yüzeyi ve ıslak yüzeylerde meydana gelen buharlaşma devamlı bir harekettir. Su yüzeyini terk eden su buharı miktarı, birim saha üzerindeki havanın özelliklerine (meteorolojik şartlar), suyun ve çevrenin özelliklerine göre değişim gösterir. Suda meydana gelen bu değişiklik bir enerji etkisiyle olmaktadır. 1 gram suyun buhar haline gelebilmesi için 539-597 kalorilik ısıya ihtiyaç vardır.

Buharlaşma; difüzyon, konveksiyon veya rüzgar tesiriyle meydana gelir. Havanın buhar basıncı, su sıcaklığına paralel olarak doymuş buhar basıncının altına düşünceye kadar difüzyon olayı devam eder. Su havadan daha sıcak olduğu zaman konveksiyon (dikey yönde hareket) hareketi başlar. Bu değeriendirmenin ışığı altında buharlaşmaya etki eden faktörleri aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz [35].

6.3.1.1 Meteorolojik Faktörler

Güneş radyasyonu, hava buhar basıncı, sıcaklık, basınç ve rüzgar buharlaşmayı etkileyen önemli meteorolojik faktörler arasındadır.

Güneş Radyasyonu

Isının başlıca kaynağı güneşten gelen radyasyondur. Azalan veya artan ısı değişimleri, buharlaşma miktarı için önemli bir faktördür. Güneşten gelen enerji miktarı mevsime, günün saatine ve havanın bulutlu veya açık olmasına göre değişir.

Radyasyon enerjisi, aynı zamanda enlem, yükseklik ve yöne göre de değişiklik gösterir.

Hava Buhar Basıncı

Buharlaşma, su yüzeyindeki buhar basıncı ile suyun üstündeki buhar basıncının arasındaki fark ile orantılıdır. Sudaki buhar basıncı (e_w), havadaki buhar basıncından (e_a) büyük olduğu müddetçe buharlaşma devam eder ve $e_w = e_a$ olunca buharlaşma durur. Buna göre hava buhar basıncı arttıkça buharlaşma miktarı azalır.

Sıcaklık

Doymuş buhar basıncı sıcaklığa bağlı olduğundan buharlaşma oranı, hava ve su sıcaklıklarından büyük miktarda etkilenir. Buharlaşmanın günlük ve yıllık değişimleri, sıcaklığın günlük ve yıllık değişmelerine çok benzer.

Gün esnasında buharlaşma sabah saatlerinde minimum, öğleden sonra 12⁰⁰-15⁰⁰ saatleri arasında ise maksimum değerine ulaşır. Yine sıcaklıkla ilgili olarak buharlaşma soğuk mevsimde az, sıcak mevsimde fazladır.

Rüzgar

Buharlaşmanın devam etmesi için difüzyon ve konveksiyon ile su buharının su yüzeyinden uzaklaşması gerekir. Bu durum havanın hareketi (rüzgar) ile mümkündür. Rüzgar hızı ne kadar fazla olursa buharlaşma o kadar fazla olur.

Basınç

Hava basıncı arttıkça birim hacimdeki molekül sayısı artar ve sudan havaya sıçrayan moleküllerin hava moleküllerine çarpıp yeniden suya dönmeleri ihtimali yükselmiş

olacağından buharlaşma azalır. Ancak bu etki diğerlerinin yanında önemsizdir. Yükseklikle basınç azaldığından, yüksek yerlerde buharlaşma fazlalaşır [35].

6.3.1.2 Coğrafik ve Topoğrafik Faktörler

Buharlaşma olayında buharlaşmanın gerçekleşeceği bölgenin, coğrafik konumu ve güneşe karşı konumu önemli yer tutmaktadır.

Enlem

Özellikle serbest su yüzeylerinden meydana gelen buharlaşma miktarının enlem derecelerine göre değişmekte olduğu tespit edilmiştir. Farklı enlem derecelerine sahip bölgelerde açık su yüzeyinde meydana gelen yıllık ortalama buharlaşma miktarları Çizelge 6.2’de verilmiştir.

Çizelge 6.2 Serbest su yüzeyinde buharlaşma miktarının enlemlere göre değişimi [35]

Enlem Derecesi	Ortalama Buharlaşma (mm/yıl)
0°- 10° (Ekvator Bölgesi)	1150
10°- 30° (Alize Bölgesinde)	2250
30° - 40° arası	1600
40° - 50° arası	1000
50° - 60° arası	450

Yükseklik

Diğer faktörler değişmediği takdirde yükseklik arttıkça buharlaşma miktarı artar. Çünkü yükseldikçe hava basıncı azalır. Diğer taraftan yükseldikçe havanın sıcaklığı azalacağından buharlaşma miktarı da azalır. Fakat bu azalma hava basıncından ileri gelen çoğalmayı telafi edemediğinden yükseldikçe buharlaşmanın az bir miktar arttığı kabul edilir.

Bakı

Güneye ve batıya bakan yamaçlardaki sular güneş ışınlarına daha çok maruz olduklarından buharlaşma kuzey ve doğuya bakan yamaçlara göre daha fazla olur [35].

6.3.1.3 Suyun Kalitesi ve Bulunduğu Ortam

Su kütlesinin büyüklüğü, tuzluluk durumu, bulanıklılığı ve hareketliliği buharlaşma miktarı üzerinde etkilidir.

Su Kütlesinin Büyüklüğü

Derin su kütleleri hava sıcaklığındaki değişimlere geç uyarlar. Bu sebeple derin sularda buharlaşma, sıg su kütlelerine göre yazın daha az, kışın daha çok olur.

Tuz Durumu

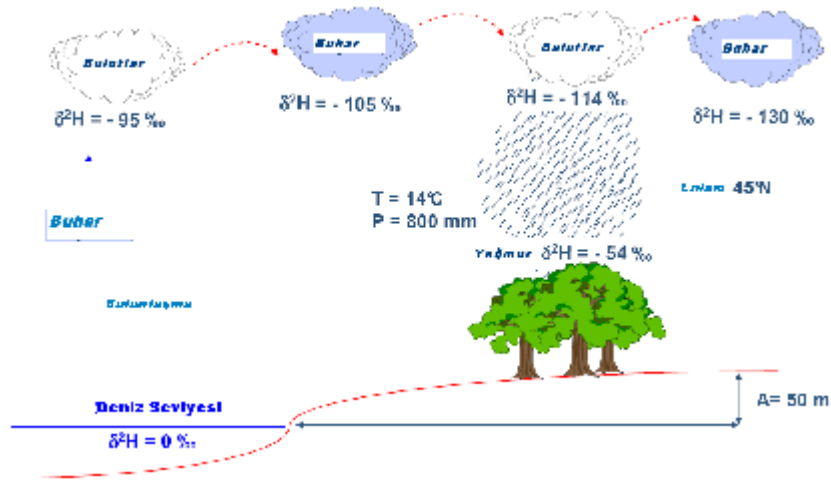
Tuzlu sular, tatlı sulara göre daha az buharlaşır. Çünkü suda erimiş tuzlar buhar basıncını azaltır.

Kirlenme

Durgun su yüzeyinde biriken yabancı maddeler toz veya yağ tabakaları, buharlaşma oranına olumsuz etki yapar [35].

Hidrojen ve oksijen izotoplarının fraksiyonlaşması su döngüsünün buharlaşma ve yoğunlaşma işlemleri boyunca sürer: okyanuslardaki su sıvı halden atmosfere buhar fazına geçer ve kuvvetli bir izotopik fraksiyonlaşmaya uğrar ki, buhar ve bulutlardaki ağır izotopların (döteryum veya ^2H , oksijen-18 veya ^{18}O) azalmasına sebep olur.

Bir hava kütlesi okyanus ve denizler gibi kaynaklardan kıtalardan geçerek bir yörünge izleyerek soğur ve yağış şeklinde su buharını kaybeder. Bu yağış (rain-out) işlemi esnasında, ağır izotoplarca zenginleşen yağmur yeryüzüne düşer ve bulutlardaki buhar kademeli olarak ağır izotopları (^2H ve ^{18}O) bünyesinden kaybeder (Şekil 6.1). İklim, coğrafik ve topoğrafik koşulların toplamının evrensel etkisi meteorik suların farklı izotopik modellemeye sebep olur [34].



Şekil 6.1 Su döngüsü ve bu döngü esnasında döteryumun fraksiyonlaşması

Bitki fizyolojisi de izotop fraksiyonlaşmasında önemli bir rol oynar; örneğin, bitkinin çevresindeki suyu (atmosfer ve topraktaki nemden) bünyesine almasına olanak sağlayan görelî diyafram ve stomanın kapanması gibi.

Olgunlaşma döneminde gerçekleşen buharlaşma-terleme aslında izotopik fraksiyonlaşmada bir etkidir. Bu işlem bitki ve meyvelerdeki sudaki hem oksijen hem de hidrojen atomlarının ağır izotoplarca zenginleşmesine neden olur. Bitki sularının izotop oranları yer altı sularına göre görelî pozitiftir. Ayrıca, asma gibi yeryüzünde yetişen bitkiler yer altında büyüyen şeker pancarı gibi bitkilere göre daha kuvvetli buharlaşma-terleme etki gösterir ki, bu özellik asmadaki şekerin döteryum içeriğinin şeker pancarındaki şekerden daha zengin olduğunu açıklar. Bu farklılık, fermentasyon sonucu elde edilen etanoldaki döteryum zenginleşmesini bölge bölge ölçme temeline dayanan SNIF-NMR'ın temel prensibidir.

6.4 Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR®)

IRMS tekniği bir molekülün tamamının izotopik içeriğini belirlerken o moleküldeki farklı pozisyonların izotopik oranları ile ilgili bilgi veremez. Gıdaların orijinalliğinin tespitine yüksek-çözünürlüklü NMR'ın en belirgin katkısı belirli bir tür içerisinde doğal zenginliği düzeyindeki özel (spesifik) moleküler bölgenin izotopik içeriğinin tespit edilebilmesine olanak tanımasıdır. NMR ile belirlenen bölge-spesifik doğal izotop fraksiyonu (SNIF-NMR® for site-specific natural isotope fractionation studied by NMR) olarak tanımlanan teknik 1980'lerin başında Nantes Üniversitesinde Prof. Gerard

ve Maryvonne Martin tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, izotopik metotların performansını geliştirmiş ve bir molekülün “doğal” veya “yapay” kökenli olup olmadığının tespiti ile ilgili gerçek, güvenilir kanıtlar sunmuştur.

SNIF-NMR yönteminin ilk uygulamaları şaraba ilave şekerin katılıp katılmamasının tespitine yöneliktir. “Chaptalization” olarak tanımlanan bu işlemin amacı, kamış şekeri, pancar şekeri veya konsantre edilmiş rektifiye şıranın üzüm suyu veya şaraba fermentasyon sırasında veya öncesinde ilave ederek şarabın alkol seviyesini yükseltmek ve market değerini arttırmaktır. Bu tüketiciyi aldatmaktır, çünkü yapılan şeker ilavesi ürün üzerindeki etikette yer almamaktadır. Bu ekonomik dolandırıcılığın en yaygın türlerinden birisidir ve amacına ulaştığında, ucuz şarabın yanlış sunumu veya mükemmel ve pahalı bir şarabın, genellikle farklı bir bölgesel yöreden hatta farklı bir ülkeden sağlanan ucuz ve düşük kalitedeki bir şarabın karıştırılmasına olanak sağlar. Bu sebeple SNIF-NMR metodu 1987 yılında Uluslararası Asma ve Şarap Organizasyonu (OIV) ve Avrupa Birliği (AB) Komisyonunca resmi metot olarak kabul edilmiştir.

Günümüzde SNIF-NMR, kimlik doğrulama (orijin tespiti), etiket kontrolü, taşış tespiti, uluslararası ticaret standartlarına uygunluk ve oldukça kompleks yapıda olan kimyasal çevrimlerin aydınlatılması gibi birçok değişik alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yöntem fermente ve destile içeceklerdeki alkollerin, meyve sularındaki karbohidratların, deniz, hayvansal ve bitkisel yağlardaki trigliserit yapıların ve türevlerinin, aroma sanayisinde kullanılan esansiyel yağların analizlerinin yapılmasına yönelik olarak da geliştirilmiştir [33].

Organik ve Biyoorganik Kimyadaki Yüksek çözünürlüklü Döteryum-NMR uygulamaları, döteryumun nükleer özelliklerinden kaynaklanan ciddi kısıtlamaların aşılmasıyla beraber son yıllarda düzenli bir artış göstermektedir [36].

Hem zayıf hassasiyetten esasen sorumlu (^1H göre 9.6×10^{-3}) küçük döner mıknatıslık oranı (4.107×10^7 rad/s/T) hem de döteryumun doğal bolluğunun çok düşük olması döteryumun doğal bolluğu spektroskopisi ile ilgili çalışmaların önündeki en büyük engellerdi. Neyse ki, nükleer Overhauser etkilerden kaynaklanan sinyal şiddetindeki uyarılmaları baskın kuadrupolar durulumalar bertaraf eder. 1980 yılından bu yana yüksek çözünürlüklü ^2H -NMR ile ilgili 300’den fazla makale yayımlanmıştır ki bunlardan 200 civarı terminolojik olarak SNIF-NMR isminin zikredildiği izotop oranlarının nicel analizi ile ilgilidir. Ayrıca, döteryumun rastgele olmayan dağılımı ile ilgili makale ve bu tür uygulamaları içeren patent ilk olarak 1981’de karşımıza çıkmaktadır [36].

6.4.1 İzotopik Bolluk ve İzotopik Oran:

Dengedeki kapalı bir sistemde (kimyasal, bitki, hayvan), belirli bir atomdaki farklı izotopların dağılımı bütün bunların tümü ve kütle-izotop dengesini sağlayan özel parametreler olarak tanımlanabilir.

Hem ağır hem de hafif kararlı izotoplara sahip bir atom için, karbon veya hidrojen gibi, izotopik bolluk (A), ağır izotopların (H) ağır ve hafif izotopların (L) toplamına oranıdır:

$$A = H/(H + L) \quad (6.1)$$

İzotop oranı (R) ise, ağır ve hafif izotopların oranı şeklinde tanımlanır:

$$R = H/L \quad (6.2)$$

A ve R basit eşitliklerle birbiri ile ilişkilidir:

$$A = R/(R + 1) \quad (6.3a)$$

$$R = A/(1 - A) \quad (6.3b)$$

Prensip olarak, belirli bir moleküler tür bir veya daha fazla sayıda izotop içeren çok sayıda izotoperlerden oluşur. Bu sebeple, $C_xH_yO_z$ şeklinde tanımlanan bir kimyasal türde, izotoperlerin teorik sayısı (N) şöyle tanımlanır:

$$N = (XH_3 + 1)^a (XH_2 + 1)^b (XH_1 + 1)^c (2^x)(3^z) \quad (6.4)$$

Tanımdaki a, b ve c; sırasıyla 4, 3 ve 1 tane izotoperik olasılığa katkıda bulunan XH_3 , XH_2 ve XH_1 gruplarının sayısını gösterir. Örneğin vanilya, $C_8H_8O_3$, 884.736 tane izotopere sahiptir.

Söz konusu düşük doğal bolluğa sahip döteryum izotopuna sahip hidrojen olduğunda, her zamanki NMR çalışmalarında bi-dötere molekül ihmal edilebilir ve genellikle sadece mono-dötere izotoperler göz önüne alınır. Bu şartlar altında, A ve R değerleri eşit olur. Bununla beraber, söz konusu karbon olduğunda A ve R parametreleri karıştırılmamalı ve bi-etiketli moleküller bu durumda ihmal edilmektedir.

Aynı zamanda izotopik içeriği, çoğunlukla IRMS'de kullanılan, görelî parametre, δ , cinsinden ifade etmek uygun olabilir. İzotopik sapma, ‰ cinsinden belirtilen, dikkate alınan örneğin veya molekülün izotopik içeriğinin (*i*), uluslararası referans maddelere, ref, ilgilendirir:

$$\delta_i = 1000(R_i - R_{ref})/R_{ref} \quad (6.5)$$

Referans, IAEA (Viyana), IRMM (Geel, Belçika), NIST (Washington, DC) gibi uluslararası organizasyonlar tarafından yürütülen laboratuvarlar arası ölçüm çalışmaları sonucu dikkatli bir şekilde kalibre edilen bir bileşiktir. Okyanus suyunun izotopik oranının ve izotopik bolluğunun Viyana Standart Ortalaması (Vienna-Standard Mean Ocean Water (V-SMOW)) sertifikalı değeri sırasıyla 155,76 ve 115,74 ppm'dir [36].

Belirli bir moleküle ait Bölgeye özgü izotop oranı, R_i , Şekilde şöyle tanımlanır:

$$(D/H)_i = D_i/H_i \quad (6.6)$$

denklemden, D_i , i bölgesindeki döteryum atomlarının sayısını belirtmektedir. Genellikle bi-döteryum moleküllerin varlığı ihmal edilebildiğinden D_i i bölgesindeki mono-döteryum izotoplarının sayısını gösterir. H_i , i cinsindeki hidrojen atomlarının sayısı $P_i N_H$ 'e eşit olup, burada P_i i bölgesindeki eşdeğer pozisyonlardakilerin sayısını ve N_H tamamen protonlanmış molekülü gösterir. SNIF'ın $^2\text{H-NMR}$ araştırmaları direk ve simültane olarak hidrojen izotop oranlarına ulaşmak için yegane yoldur ve belirli bir moleküldeki farklı pozisyonlardaki i atomlarının ilişkisi $(D/H)_i$ olarak gösterilir.

Aynı zamanda göreceli bir parametreyi tanımlamakta daha kullanışlıdır, $R_{i/j}$:

$$R_{i/j} = F_i S_j / S_i \quad (6.7)$$

denklemden, S_i veya S_j sinyallerinin şiddetini, $R_{i/j}$, j bölgesindeki genellikle atomların stokiyometrik sayısını, F_i , bir durumda i bölgesindeki ağır atomların sayısını belirtmektedir.

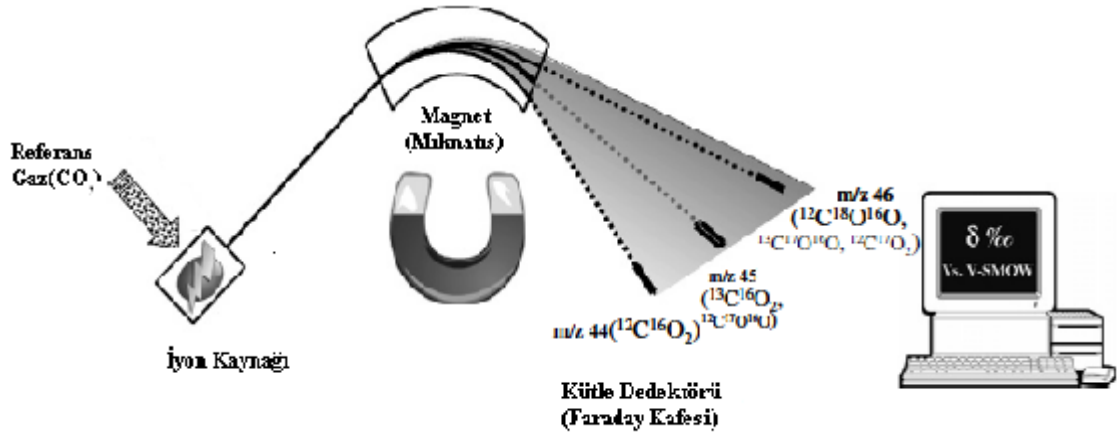
Prensip olarak S NMR sinyalinin alanıdır. Ancak, $R_{i/j}$ sinyal alanlarından daha iyi bir kararlılıkla ölçülen sinyal yükseklikleri şeklinde daha basit bir biçimde tanımlanabilir. Bir moleküler türdeki farklı örneklerde ölçülen $R_{i/j}$ parametreleri, sinyal yükseklikleri kullanılarak hesaplandığında kesinlikle aynı şartlarda hazırlanan örneklerin sadece sabit dönüşüm durulma zamanları sağlandığı durumlarda daha güvenli bir biçimde hesaplanabilmektedir. Etanol molekülü göz önüne alındığında; metil ve metilen bölgesindeki döteryum sinyallerinin pik genişlikleri neredeyse eşit olmakta ve sinyal yüksekliklerinin oranı sinyal alanları oranına oldukça yakın olmaktadır. Metilen bölgesi, $i \equiv II$, metil bölgesiyle, $j \equiv I$, kıyaslandığında stokiyometrik sayısının $F_I = 3$ olmasıyla karakterize edilen hidrojen atomlarının, $R_{II/I}$ değerinin genellikle baskın bir

biçimde istatistiksel değer olan 2'den farklı olduğu görülmektedir ki, bu döteryum atomlarının rastgele bir dağılıma sahip olduğu sonucunu doğurmaktadır. Örneğin, pancar şekerinin fermantasyonu sonucu elde edilen etanolun $R_{II/I}$ değerinin 2,7'den büyük olduğu tespit edilmiştir.

Fotosentez için gerekli hidrojen kaynağı sadece su iken, oksijen bitkiler tarafından atmosferden oksijen ve karbondioksit, topraktan ve su havuzları gibi farklı kaynaklardan alınmaktadır. Kısaca, meyve suları ve bunlardan elde edilen birtakım gıdalardaki bitkisel kaynaklı suların ^2H ve ^{18}O içeriği, bu ürünlerin hangi kaynaklardan elde edildiğini yansıtır [36].

6.5 İzotop Oranı-Kütle Spektroskopisi (IR-MS)

Kararlı izotopların analizi doğal sistemlerdeki izotopik fraksiyonların belirlenmesi ile gerçekleştirilir. İzotop oranlarının hassas bir şekilde belirlenmesi amacıyla kullanılan Kütle Spektrometreleri magnetik sektördür. Magnetik sektör, quadrupole sistemlere göre iki büyük avantaj sağlar. Birincisi birden fazla toplayıcı sistemle kullanılır-yani eş zamanlı olarak farklı izotop oranlarının belirlenmesine olanak verir. İkincisi ise yüksek kalitede eğrilerin alınabilmesidir. Bu iki özellik de hassas şekilde izotop oranlarının belirlenmesi için gereklidir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2 Simultane izotop analizi yapılan IRMS'teki iyon kaynağı, magnet ve Faraday kafesinin genel dizilimi [33]

IRMS ile ölçülen izotopik zenginleştirilmesi mil başına (‰) cinsinden uluslararası standartlara karşın delta (δ) gösterimiyle aşağıdaki eşitlikte örnek olarak karbon (C) atomu cinsinden şöyle ifade edilir [23]:

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left(\frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{örnek}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{std}}} \right) \times 1000 \text{ ‰} \quad (6.8)$$

$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve D/H izotop oranları için *V-SMOW* (*Vienna Standard Mean Ocean Water*), $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ için *PDB* (*Pee Dee Belemnite*), $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ için atmosferik hava ve $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ için *CDT* (*Canyon Diablo Troilite*) birincil uluslararası standartlardır. Tanıma göre bu standartların δ değerleri sıfır olarak kabul edilir.

6.5.1 Oksijen ve Hidrojen

Sıcaklık oksijen (^{18}O) ve hidrojen (^2H) izotoplarının zenginleştirmesinde yağış şeklinde küresel olarak etkileyen en önemli faktörlerdendir. Sıcaklık değişimleri ^{18}O ve ^2H geçişlerine neden olur ve bu geçişleri yansıtabilecek düzeyde modeller geliştirilebilir. Sturm ve arkadaşları (2005), Dangard (1964)'ın daha önceki çalışmasına dayanan denklem $\delta^{18}\text{O}\text{‰} = 0,695T_{\text{yılık}} - 13,6$, ^{18}O izotopunun zenginleştirmesini orta ve yüksek enlemlerde oldukça yakın olarak yağış biçiminde tahmin edebilmişlerdir. Ancak, düşük enlemlerde yağışın izotopik içeriği yağın yağmur miktarı ile yakından ilgili olduğu tespit edilmiştir ki, yağmurlu sezonlarda bu değerlerin düştüğü gözlemlenmektedir. Bu küresel eğilime ek olarak, kıtasallık ve yüksekliğin yerel etkileri de önemli ölçüde yağış izotop dağılımını değiştirmektedir. Kıtasallık, kıyıda iç bölgelere hareket eden bulutların devam eden izotopik tükenmesini açıklar. Bu etki kışın yaza göre daha baskındır.

İkinci önemli etki denizden olan yüksekliktir ki, aslında bu etki yeryüzünden yükselen buhar kütlelerinin soğuyarak yoğunlaşmasıdır. Yükseklikteki her 100 metre artış ağır izotoplarda $\delta^{18}\text{O}$ için -0,15 ile -0,5 ‰ ve $\delta^2\text{H}$ için -1 ile -4 ‰ arasında bir değişim göstermektedir. Bitki ve hayvanlardaki oksijen ve hidrojen arasındaki değişen izotopik zenginleştirme genellikle bölgesel yağışlardan etkilenmektedir, çünkü alınan suyun bütün kaynaklarının zenginleştirilmesi bitkisel ve hayvansal metabolizma tarafından şekillenmektedir. Hidrojen ve oksijen izotoplarının doğal bollukları çevre ile ilişkilidir ve aynı kurala uyar. Benzer olarak, gıdalardaki aynı örnek içindeki oksijen ve hidrojen arasındaki değişen izotopik zenginleştirme aynı parametrelerle ilişkilidir ve bu sebeple genellikle sadece biri ölçülür [33].

6.5.2 Karbon

Bitkiler metabolizmalarındaki farklılıktan ötürü üç kategoriye ayrılırlar [37]:

6.5.2.1 Kalvin Döngüsü Metabolizması

Fotosentezdeki karbon tutulumu mekanizmalarından biridir. **C₃ karbon tutulumu mekanizması** olarak da adlandırılır ve bu tür metabolizmaya sahip bitkilere **C₃ bitkileri** denir.

Bu süreçle karbondioksit ve ribulozbifosfat (RuBP, 5 karbonlu bir şeker), aşağıdaki reaksiyonla 3-fosfogliserata dönüştürülür:



Bu reaksiyon bütün bitkilerde Kalvin-Benson döngüsünün ilk adımı olarak meydana gelir.

C₃ bitkileri, güneş ışınları şiddetinin orta düzeyde, ortam sıcaklığının yine orta düzeyde olduğu, karbon dioksit miktarının 200 ppm veya daha yüksek miktarda ve yer altı sularının bol olduğu bölgelerde yetişirler. C₃ bitkileri köklerinden aldığı suyun yaklaşık % 97'sini terlemeyle kaybederler.

C₃ bitkileri sıcak bölgelerde sıcaklığın artmasıyla RuBisCO ve RuBP'ye daha fazla oksijen bağlar. Bu fotosolunuma yol açar ve karbon ve azot kaybına neden olduğundan bitkinin büyümesini kısıtlar [37].

C₃ bitkilerine örnek olarak pirinç, arpa ve şeker pancarı örnek verilebilir ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri -26 ila -30 ‰ arasındadır [33].

6.5.2.2 Hatch-Slack Metabolizması

C₄ karbon tutulumu mekanizması olarak da adlandırılır ve bu tür metabolizmaya sahip bitkilere **C₄ bitkileri** denir. C₄ mekanizmasının işleyişi iki Avustralyalı araştırmacı M. D. Hatch ve C. R. Slack tarafından 1966'da bulunmuştur.

C₄ fiksasyonun, bitkilerin çoğunda görülen ve daha basit olan C₃ mekanizmasından farklı olduğu anlaşılmıştır. Her iki mekanizmada (Kalvin döngüsünde oluşan ilk enzim) olan RuBisCO'nun fotorespirasyonu veya karbon bileşiklerinden CO₂'in oksijen kullanılarak kırılması oluşan enerjiyi harcamak içindir.

Yine de C₄ fiksasyonu ATP formundaki enerji girişine C₃'den daha çok ihtiyaç duyar. C₄ bitkilerinde, rubisco mezofil hücrelerinde karbonu bağlayarak, oksaloasetatı ve malatı kullanarak atmosferik oksijenden ayrılır, bağlanmış karbon rubiscoya taşınır ve

Kalvin döngüsü enzimleri demet kını hücrelerinde izole edilir. Orta seviyeli bileşiklerin her ikisi de 4 karbon atomu içerir, bu yüzden de C₄ olarak isimlendirilirler [37].

Metabolizmanın İşleyişi

C₃ bitkilerinde fotosentezin ışıklı devre reaksiyonları sırasında ilk adım olarak RuBisCo enzimiyle 3-fosfoglisarat içinde CO₂ fiksasyonu yapılır. RuBisCo'nun karboksilaz/oksigenaz aktivitesiyle substrat miktarı enerji yok olması ve substrat kaybıyla sonuçlanan ve fotorespirasyon olarak bilinen yolla, karboksillenme oksitlenmeye tercih edilir. Fotorespirasyonu atlayan yolla C₄ bitkileri CO₂'i RuBisCo enzimine etkileyici şekilde dağıtma yolunu geliştirmişlerdir.

C₄ bitkilerinde iki fotosentez yolu birlikte çalıştığı için bu bitkilerin fotosentez kapasitesi fazladır. Oldukça düşük CO₂ oranlarında ve stomaların kapalı olduğu durumlarda bile iyi fotosentez yapabilirler. C₄ bitkilerinde CO₂'i yakalayan iki enzim bulunur. Metabolik yolunda;

- I. döngü: mezofil hücreleri ve kloroplastlarda,
- II. döngü: aynı yaprağın demet kını hücrelerinin kloroplastlarında gerçekleşir.

C₄ bitkilerinde çok yüksek aktiviteye sahip olarak bulunan PEP karboksilaz enzimi CO₂'e çok duyarlıdır. Bu enzim substat olarak bikarbonat kullanır. PEP-karboksilazın bikarbonatla ilgisi RuBisCo enziminin CO₂'e olan ilgisinden çok fazladır. Bu yüzden bu enzim düşük CO₂ konsantrasyonlarında bile yüksek reaksiyon yapar. İşte bu yüzden C₄ bitkilerinde çok düşük CO₂ derişimlerinde bile fotosentez hızı yüksektir [37].

Bu tür bitkilere mısır, şeker kamışı, semiz otu, *Sorghum* ve *Cyperus* örnek olarak gösterilebilir ve $\delta^{13}\text{C}$ değeri -12(-8) ile -14 ‰ arasındadır [33].

6.5.2.3 Krassulasean asit metabolizması

CAM veya **Crassulaceae asit metabolizması bitkileri** ya da CAM fotosentezi, bazı fotosentetik bitkilerde görülen karbon fiksasyonu yoludur.

Bu bitkiler genellikle sukkulent yapıdadırlar. Tuzcul ortamlarda yaşayan halofit bitkiler ile epifit bitkilerin CAM tipi fotosentez yaptıkları bilinir. Böyle bitkiler karanlıkta ve özellikle geceleri açılan stomalardan içeri CO₂'i alırlar. Karbondioksitin indirgenmesi sonucu oluşan ilk kararlı maddenin malik asit olduğu belirlenmiştir. Nitekim karanlıkta bu reaksiyonu katalize eden enzimin PEP karboksilaz olduğu ve bu enzimin karanlıkta

yüksek etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Bu reaksiyon sonucu oluşan malik asit vakuolde birikim gösterir. Stomaların genellikle kapalı olduğu ışıktaki malik asit dekarboksilasyona uğrayarak pürivik aside dönüştürülür. Malik asidin pürivik aside dönüşümü sırasında açığa çıkan CO₂ ise RudiP karboksilaz enzimi etkinliği ile 2 mol fosfoglisarik asidi (PGA) oluşturur. Daha sonra PGA'dan PGAL oluşur. Bu bitkilerin yaprak anatomilerine bakıldığında, yüzeylerinde çok kalın bir kutikula tabakası bulunur. Palizat parankiması iyi gelişmemiştir, sünger parankimasıyla fotosentez yaparlar. Az sitoplazmalı çok geniş vakuollüdür, çoğu sukkulenttir ama her sukkulent yapıtlı bitki CAM değildir. İletim demetlerinin etrafında demet kını hücreleri vardır, stomalar gündüz kapalı, geceleri açıktır [37].

CAM metabolizması bitkilerine ananas, kaktüs ve vanilya verilebilir ve $\delta^{13}\text{C}$ değeri C₃ ve C₄ metabolizması bitkileri arasındadır [33].

6.5.3 IRMS'in Temel Prensipleri

Yükü atom ve moleküller bir kütle spektrometresinde kütle'nin yüke oranını (m/z) baz alınarak ayrılırlar. Kütle numarası, bir atom, moleköl ya da iyondaki proton ve nötronların toplamıdır. Sonrasında iyonların doğal bollukları bölgesel olarak ayrılan iyon sinyallerinden kaynaklanan akımların ölçölmesiyle belirlenir [33].

6.5.3.1 Numune Hazırlama ve Arayüz Cihazları

Bir IRMS'te bütün anorganik ve organik bileşikler mutlaka CO₂, N₂, SO₂, H₂, CO gibi basit gazlara dönüştürölmelidir. Numune hazırlama aygıtlarının teknolojisii arayüz ve transfer biçimleriyle yakından ilgilidir. IRMS'de çift girişli ve sürekli akış tarzı şeklinde iki metot vardır. IRMS'de en çok kullanılan biçim sürekli akış modudur ve sadece bu tarz üzerinde durulacaktır.

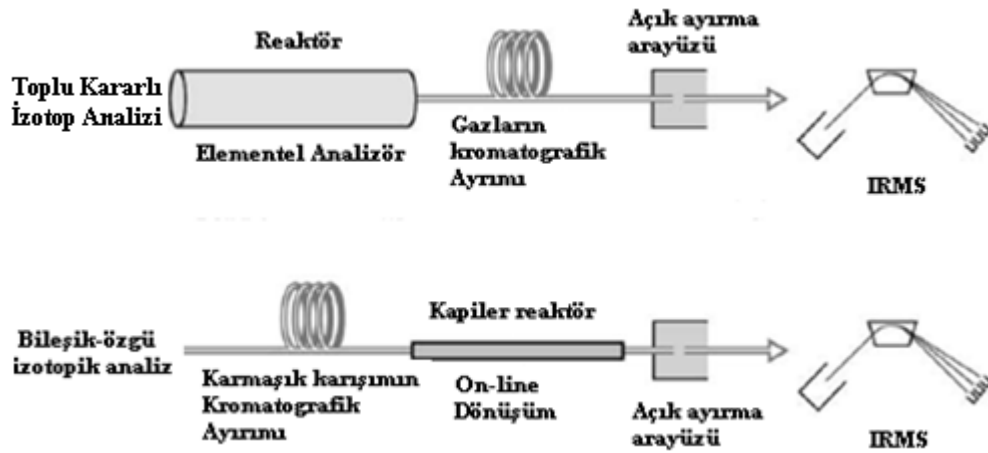
6.5.3.2 Sürekli Akış IRMS

Sürekli akış IRMS, açık ayırma arayüzü ve helyumun taşıyıcı gaz olarak kullanılarak örneklerin IRMS'e transferinin yapıldığı moddur. Kromatografik ayırım, sürekli akış uygulamalarının dönüşüm işleminin öncesinde veya sonrasında yer alır. **Bileşik-özgü izotop analiz**, karmaşık bir organik bileşiklerin karışımının her bir bileşiğın CO₂ gibi basit bir gaza on-line dönüşümü öncesi gaz veya sıvı kromatografi ile ayrılması ilkesine dayanır. **Toplu kararlı izotop analizinde** ise örnek bütün olarak geleneksel elementel

analizörle basit gazlara dönüştürülür ve sonrasında üretilen basit gazlar kromatografik ayırma tabi tutulur. Kısaca işlem şu aşamalardan geçer:

Katı ve sıvı örnekler küçük kalay kapsüllere tartılırlar ve katı oto örnekleyiciye yerleştirilirler. Örnekleyicinin hareketiyle kapsül, çalışılan element türüne göre farklı sıcaklıklara ayarlanabilen ancak genellikle 1020-1100°C'deki yanma reaktörüne alınır. Örnek ve kapsül oksijence zengin helyum akımında yakılır. Yanan ürün sabit bir helyum akışıyla CrO₃ gibi yükseltgenme katalizörü boyunca taşınır.

Yükseltgenen ürünler 650°C'de bakır granüllerin yer aldığı indirgeyici reaktöre geçer ki burada azotun oksitleri (NO, N₂O & N₂O₂) azota(N₂) indirgenir ve oksijenin fazlası uzaklaştırılır. Elde edilen gaz türleri (karbon için CO₂, azot için N₂, kükürt için SO₂, hidrojen için H₂ ve oksijen için CO) nemden arındırılması için magnezyum perklorat bir filtreden geçirilir. Kalan CO₂ ve varsa N₂, SO₂ birbirlerinden farklı alıkonmalara tabi olmaları için kısa bir kolondan geçirilirler. Sonrasında Isı İletkenlik Detektöründen (TCD) geçerek cihazın tepesindeki tahliyeden dışarı atılırlar. Toplu kararlı izotop analizi aynı anda birden fazla gazın incelenmesine olanak sağlar. Toplu kararlı izotop analizi ile Bileşik-özümlü izotop analizinin karşılaştırılması şematik olarak Şekil 6.4'de görülmektedir [33].

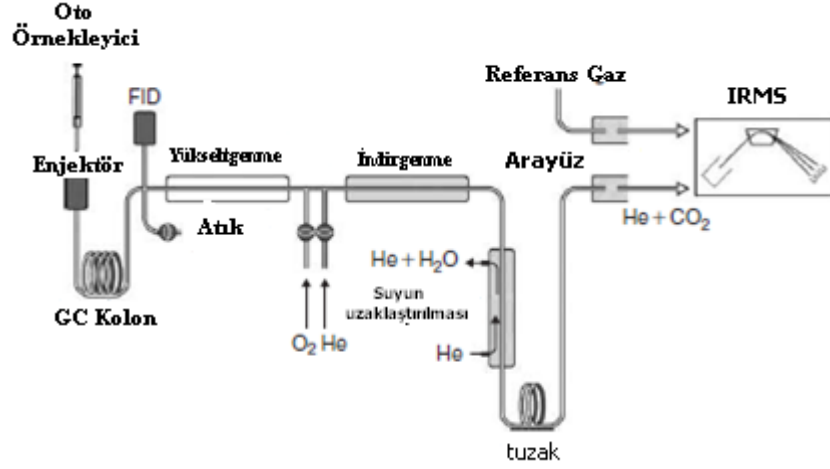


Şekil 6.4 Toplu ve bileşik-özümlü kararlı izotop analiz sistemlerinin genel görünümü [33]

(Gaz Kromatografi-Yanma)-IRMS ((GC-C)-IRMS)

Bileşik-özümlü izotop analizi, toplu kararlı izotop analizine oranla numunenin doğal veya sentetik işlemlerle elde edilmesiyle ilgili kıymetli ilave bilgiler verir. Oldukça karmaşık yapıdaki karışımların kapiler silika kolon vesilesiyle ayrılmasının ardından GC yanma

ara yüzünden sonra IRMS'e ulaşır (Şekil 6.5). Örnek split/splitless, programlanabilir buharlaşma enjektörü gibi yollarla kolana ulaştırılır. Ayrıca analiz aynı anda paralel olarak alev iyonlaşma detektöründen (FID) de takip edilebilir.



Şekil 6.5 Bileşik-özü izotop analizi sistemlerinden (GC-C)-IRMS sisteminin şematik görünümü

Yüksek-kararlılık izotop oranı belirlemek için, iyon kaynağının basıncını sürekli sabit kalmalıdır. Bu sebeple, sürekli akış sistemlerinin IRMS'e bağlantı ara yüzleri mutlaka bir "açık ayırma" aracılığıyla bağlanmalıdır. Bir açık ayırmanın temel prensibi helyum akışı altındaki örneğin çok küçük bir parçasının veya kolon yardımıyla ayrılmış bileşiği istenilen aralıkta IRMS'e verilmesidir [33].

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

7.1 Deneyisel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar, sarf maddeler ve temin edildikleri firma bilgileri Çizelge 7.1’de gösterilmektedir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

7.2 Deneyisel Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sistemler

Çalışmanın deneyisel kısmında kullanılan araç ve gereçler aşağıda verilmiştir:

- SNIF-NMR® Sistemi: Üzerinde 10 mm BBO Prop bulunan Bruker Avance II 400 Mhz NMR Spektrometre cihazı
- HPLC Sistemi: Waters Breeze model HPLC (Waters 600 pompa, Water 717 oto örnekleyici, amino ön kolon, Waters silika bazlı propil amin kolon, kolon fırını, Waters 2414 kırılma indisi detektörü ve Empower 2 Yazılımı)
- İTK Sistemi: CAMAG İTK Sistemi (ATS4 oto örnekleyici, AMD2 ve ADC2 oto yürütücü, plaka daldırma cihazı, plaka püskürtme cihazı, plaka ısıtıcısı, Scanner 3 tarama cihazı ve winCATS yazılımı)
- IRMS Sistemi: Isoprime 100 MS, Elementar Microcube, Agilent 7880 GC.

Çizelge 7.1 Kullanılan kimyasallar, sarf maddeler ve temin edildikleri firma bilgileri

Temin Edilen Firma	Kimyasal ve Sarf Malzeme Adı	Ürün Kodu
Sigma-Aldrich	D-(+)Glikoz	16325
	D-(-)Fruktoz	1576
	Sakkaroz	16104
	Amonyum hidroksit çözeltisi (% 28)	338818
	Çinko nitrat hekzahidrat	96482
	Bakır (II) nitrat trihidrat	61194
	Saccharomyces cerevisiae maya	YSC2
	1-Butanol	34867
	Asetonitril	34998
	Susuz etanol	34923
Aldrich	Hekzaflorobenzen	326720
Supelco	Aspartam	47135
Supelco	Sodyum sakarin	47839
Merck	Apura Combititrant 1:5 Composit	188005
	Combimetanol	188009
	Etil asetat	100868
	Karbon tetraklorür	102222
	Asetik asit	100062
	Sodyum tartarat	106664
	Sodyum, kalsiyum, magnezyum, potasyum, fosfor, mangan standart çözeltileri	119507,170373,119788, 170219, 170340,170332
	20×10 HPTLC 60 F ₂₅₄ cam	105642
	20×20 TLC 60 F ₂₅₄ alüminyum	105626
	20×10 HPTLC 60 cam	105641
DIFCO	Azot bazlı amino asit içermeyen bakteri mayası	291940
IRMM	Tetrametil üre (TMU)	STA-003k
	Standart etanol çözeltileri (H, L, M),	BCR 123
	Standart glukoz	BCR 656
	Standart sulu etanol çözeltisi	BCR660

7.3 Deneyisel Çalışmada Kullanılan Diğer Yardımcı Aletler

- Ultra saf su cihazı (Human Zeneer UP 900)
- Homojenizatör (Retch Grindomix Gm 200)
- Dijital Refraktometre (Metler Toledo RM4O)
- Karl-Fischer Volumetrik Su Tayin Cihazı (Metler Toledo V20)
- pH-Metre (WTW Inolab pH 720)
- Ultrasonic Banyo (Elmasonic S 60)
- Etüv (MMM Medcenter)
- İnkübatör (MEMMERT IPP 400)
- Tepe Üstü Karıştırıcı (IKA EUROSTAR power basic)

7.4 Analiz Edilen Örnekler

7.4.1 Aspartam ve Sodyum Sakarin İlavesi Yapılan Örnekler

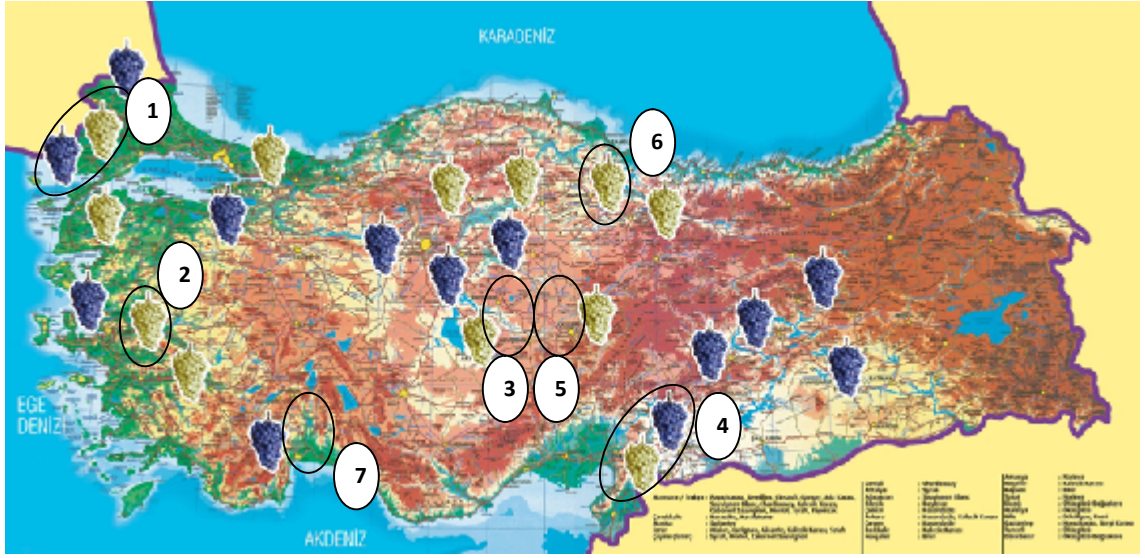
Aspartam ve sodyum sakarinin kullanılabileceği gıdalara benzer, içinde aspartam ve sakarin bulunmayan ürünlerin ticari isimleri, içerdikleri maddeler Çizelge 7.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 7.2 Aspartam ve sodyum sakarin ilave edilerek yapılan çalışmada kullanılan gıda ürünleri ve özellikleri

Numune No	Numunenin Ticari Adı	Numunenin İçeriği
1	Afrin üzüm pekmezi	Üzüm suyu konsantresi
2	Mix Patisserie	Mısır unu, mısır nişastası, gam
3	Bebelac Junior	Laktoz, yağı alınmış süt, bitkisel yağlar, vitaminler
4	Toblerone	Çikolata, sakkaroz, süt yağı, bal

7.4.2 Pekmez Numuneleri

Araştırmamızda incelenen pekmez numuneleri Şekil 7.1’deki Türkiye üzüm haritası üzerinde görüleceği üzere Trakya, Ege, İç Anadolu, Karadeniz, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden seçilmiştir. Elde edilen kaynaklar ve detayları Çizelge 7.3’de yer almaktadır.



Şekil 7.1 Türkiye üzüm haritası (Daire içine alınan bölgeler incelenen numunelerin alındığı yerleri göstermektedir) [38]

Çizelge 7.3 İncelenen Pekmez Numuneleri ve Bölgeleri

Numune No	Numune Adı	Üretildiği Üzümün Bölgesi
1	Tekirbağ üzüm Pekmezi	Trakya-Tekirdağ
2	Tariş üzüm pekmezi	Ege-Manisa
3	Karacaşar tatlı kırmızı pekmez	İç Anadolu-Nevşehir
4	Afrin üzüm pekmezi	Güneydoğu Anadolu-Kilis
5	Ev yapımı üzüm pekmezi	İç Anadolu-Kayseri
6	Özkaleli üzüm pekmezi	Orta Karadeniz-Tokat
7	Ev yapımı üzüm pekmezi	Akdeniz-Antalya(Akseki)

7.4.3 Üzüm Numuneleri

Çizelge 7.3'te yer alan birtakım pekmez örneklerinin elde edildikleri üzüm suyu ve kuru üzüm numuneleri incelenmiştir. İncelenen örneklerin bilgileri Çizelge 7.4'tedir.

Çizelge 7.4 İncelenen üzüm suyu, kuru üzüm numuneleri ve üretildikleri bölgeler

Numune No	Numune Adı	Üretildiği Bölge
1	Tekirbağ % 100 üzüm suyu	Trakya-Tekirdağ
2	Tariş sultaniye kuru üzümü	Ege-Manisa
3	Kırmızı kuru üzüm	İç Anadolu-Nevşehir
4	Çekirdekli urumu (rumi) kuru üzüm	Güneydoğu Anadolu-Kilis
5	Siyah kuru üzüm	İç Anadolu-Kayseri

7.4.4 Pekmez Numunelerine Tağış Adına İlave Edilebileceği Düşünülen Tatlandırıcılar

Pekmez örneklerine dışarıdan sahtecilik adına ilave edilebileceği düşünülerek seçilen sakkaroz ve şeker çözeltilerinin özellikleri Çizelge 7.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 7.5 Pekmeze ilave edilebileceği düşünülen tatlandırıcılar ve özellikleri

Tatlandırıcı Adı	Elde Edildiği Kaynak	Özellikleri
Sakkaroz	Şeker Pancarı	% 100 sakkaroz
Isosugar 041	Mısır Nişastası	% 55 Fruktoz (kuru bazda) içeren fruktoz-glukoz şurubu
Isosugar 551	Mısır Nişastası	% 30 Fruktoz (kuru bazda) içeren fruktoz-glukoz şurubu
Glucoamyl H 361	Mısır Nişastası	DE değeri 50-64 arasında glukoz şurubu

Pancar şekeri yerel marketlerden Isosugar 041, Isosugar 551 ve Glucoamyl H 361 numuneleri Amylum Nişasta San. A.Ş.’den (Tate & Lyle) temin edilmiştir.

7.4.5 Tatlandırıcı İlavesiyle Kirletilen (Tağış) Yapılan Örnekler

4 Nolu pekmez numunesi, pancar şekeri, Isosugar 041, Glucoamyl H 361 ticari isimli şeker çözeltileri ile ayrıca 1 nolu pekmez numunesi de pancar şekeri ve Isosugar 551 ile ayrı ayrı % 50 oranında karıştırılmak suretiyle kirletilmiştir.

7.5 Deneysel Çalışmalar

7.5.1 Tatlandırıcıların İTK ile Analizleri

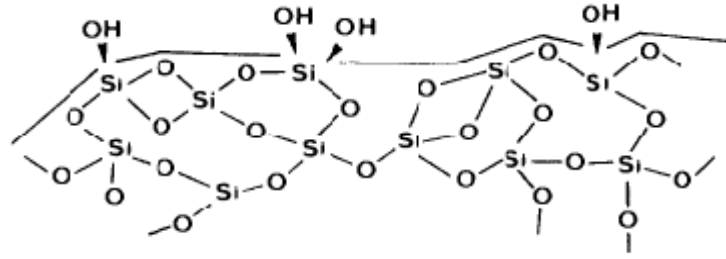
Tatlandırıcıların, insan sağlığı üzerine süre gelen tartışmaları, mevcut tebliğ ve direktiflere uygunluğunun ve T.C. Başbakanlık Gümrük Müsteşarlığı bünyesine gelen numunelerin kontrolü göz önüne alındığında; geniş bir gıda matrisine uygulanabilirliği olan, kısa analiz süresine sahip, ekonomik, analiz ön hazırlığını en az düzeye indirebilen, aynı anda birden fazla numunenin analizine farklı tanı prensiplerinin uygulanabilirliğine izin veren bir yönteme ihtiyaç duyulduğundan tatlandırıcıların özellikle nicel analizlerinin İTK’de yapılması düşünülmüştür.

İTK analizleri off-line prensibi ile çalışmakla beraber, her ne kadar her bir basamakta modern enstrümanlar kullanılsa da tamamen otomatik bir sistem şu ana kadar mevcut değildir. Basamaklar arası geçişte plakanın manuel olarak taşınması gerekir.

7.5.1.1 Analiz Yapılacak Plaka Cinsinin Tespit Edilmesi

Yaklaşık olarak İTK sorbenti olarak kullanılan 25 adet inert materyal mevcuttur, bunların bazıları genel kullanıma dönükken bazıları ise özel kullanıma uygundur [32].

1973 yılında Scott tarafından yapılan bir çalışmada taranan yaklaşık 1100 İTK makalesinde, % 64 oranında silika jel bazlı, % 9 oranında selüloz bazlı ve % 3 oranında alümina bazlı plakaların kullanıldığı tespit edilmiştir. Silika jelin kimyasal yapısı Şekil 7.2’de belirtilmiştir.



Şekil 7.2 Silika jelin kimyasal yapısı [32].

Günümüzde de en yaygın kullanılan plaka silika bazlı olduğu için öncelikle bu tür plaka sabit faz olarak seçilmiştir. Daha ekonomik olması itibariyle ön denemeler, 20×10 cm boyutlarındaki alüminyum plaka üzerinde yer alan silika jel bazlı ince tabaka ile gerçekleştirilmiştir. Ön denemelerden alınan sonuçlara göre son olarak cam levhalar üzerinde bulunan yüksek performanslı ince tabakalar kullanılmıştır.

7.5.1.2 Plakaya Uygulama Yapılmadan Önceki Önlemler

İTK yönteminin basamaklarından biri gibi görünmese de plakanın uygulama için hazırlanması işlemi önemlidir ve yine birtakım manuel işlemler gerektirmektedir. Kromatografik plaka çok hassas bir parçadır, yüzeyi kolaylıkla zarar görebilmekte ve kirlenebilmektedir. Bu yüzden özellikle tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için uygulama yapılmadan önce her plakaya şu işlemler yapılmıştır:

Sadece laboratuvar ortamından değil, plakaların muhafazası için sarıldıkları polimer filminden veya diğer safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla silika bazlı plaka, metanol içine daldırılmış ve 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra temizlenen plaka sıcaklığı 120°C’ye ayarlanmış bir etüvde 20 dakika bekletilerek hem kurutulmuş hem de aktive edilmiştir. Son olarak aktive edilen plaka geniş ve boş bir desikatör içerisinde muhafaza

edilerek hem oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuş hem de laboratuvar ortamı ile plaka arasındaki nem dengelenmiştir.

7.5.1.3 Uygulama İşlemi Tekniğinin Belirlenmesi ve Uygulamanın Yapılması

Özellikle nicel analizlerde tercih edilen ve sadece aletsel olarak yapılabilen püskürtme tekniğiyle bant şeklinde otomatik uygulama yapabilen ve tamamen yazılım kontrollü CAMAG ATS 4 cihazı kullanılarak 1 µL'den 15 µL'ye kadar numune uygulaması yapılmıştır.

7.5.1.4 Plakaya Yapılan Uygulamanın Manuel veya Otomatik Yürütülmesi

İTK'de diğer kromatografik tekniklerden farklı olarak sabit ve hareketli faza ilaveten gaz fazı vardır ve bu faz çoğunlukla kromatografiyi etkiler. Tekrarlanabilir sonuçlar ancak bütün parametreler sabit tutulduğunda elde edilebilir. Bu yüzden, yürütme işlemine başlamadan önce mutlaka sabit, hareketli ve gaz fazının dengede olması gerekmektedir. Manuel yürütme CAMAG çift oluklu yürütme tankları kullanılarak yapılmıştır. Otomatik yürütme işlemi ön denemelerden sonra çözücü veya çözücü karışımlarının belirlenmesinden sonra CAMAG AMD2 ve ADC2 cihazları kullanılarak yapılmıştır.

7.5.1.5 Plaka Üstündeki Standart ve Numunelerin Direk veya Türevlendirildikten Sonra Değerlendirilmesi

Tatlandırıcı standartlarının uygulaması yapılan plaka, 190-800 nm aralığında absorpsiyon veya floresans modunda tarama yapabilen CAMAG İTK Scanner 3 kullanılarak taratılmış ve elde edilen veriler, CAMAG winCATS yazılımı kullanılarak değerlendirmenin yapılabilirliği ve değerlendirmenin yapılacağı dalga boyu tespit edilmeye çalışılmıştır.

7.5.2 Aspartam Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

0,1 mg duyarlılıkla 100 mg aspartam tartılıp 100 mL'lik ölçü balonuna aktararak 1 g/L tatlandırıcı içeren stok çözelti hazırlanıp ayrı ayrı 1 mL ve 10 mL alınmak suretiyle 100 mL'ye seyreltilerek 10 ng/µL ve 100 ng/µL aspartam içeren çalışma çözeltileri elde edilmiştir.

7.5.2.1 Aspartam Lekelerinin Değerlendirilmesi Koşullarının Belirlenmesi

Öncelikle aspartamın karakterize edilebilmesi ve değerlendirmenin ne suretle yapılacağıın tespiti için, silika plaka üzerine 5 µL 100 ppm'lik aspartam çözeltisi uygulanmıştır. Aspartamın HPLC ile tayini için çalışma dalga boyunun 220 nm olduğu literatürde verilmiştir [1]. Aspartam uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan plaka, bu veriler ışığında absorbands/reflaktans modunda 190-350 nm dalga boyu aralığında 5,0 nm aralıklarla taratılmış ve elde edilen densitogramlar Şekil 8.1 ve Şekil 8.2'de gösterilmiştir.

Oto örnekleyici kullanılarak püskürtme tekniğiyle bant şeklinde 20×10 cm boyutlarındaki cam plaka üzerinde yer alan silika jel bazlı ince tabaka (60 F₂₅₄) üzerine numune uygulanmıştır. Arkasından yürütmenin yapılacağı çift oluklu tank, 10 dak. butanol:asetik asit:su (4:1:1) karışımından oluşan hareketli fazın buharıyla doyurulmuş, ADC 2 oto yürütücü ile hareketli faz plaka üzerinde 70 mm kadar yürütülmüş ve plaka 110°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Lekelerin gözlemlenebilmesi için asetondaki % 0,2 ninhidrin çözeltisi, plaka yüzeyine püskürtmeyle ve plakanın bu çözeltiye 3 saniye daldırılması suretiyle uygulanmıştır. Sonrasında 110°C'ye ayarlanmış etüvde 30 dak. bekletilmiştir.

7.5.2.2 İnce Tabaka Üzerinde Meydana Gelen İstenmeyen Renklenmenin Giderilmesi

Zeminde gözlemlenen kızarıklığın giderilmesi amacıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- a) Plakaya numune uygulanmasının ardından yürütücü fazla plaka 70 mm yüksekliğe kadar yürütülmüş sonrasında plaka henüz ıslakken amonyak buharıyla doymun hale getirilmiş % 25'lik amonyak çözeltisinin yer aldığı çift oluklu tankta 5 dak. bekletilerek 100 °C'deki etüvde 30 dakika kurutulduktan sonra, ninhidrin çözeltine daldırılmış ve 120°C'deki etüvde 10 dak. bekletilmiştir.

Sonrasında plaka yüzeyine seyreltik asetik asit püskürtülmüş ve yeniden ninhidrin çözeltisine daldırılarak 100°C'deki etüvde 10 dak. bekletilmiştir. Son olarak ısı tabancasıyla plaka yüzeyi yüksek sıcaklığa maruz bırakılmıştır.

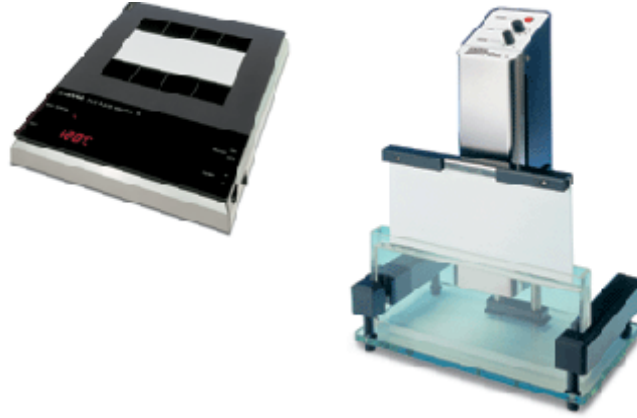
- b) Plakaya yürütücü faz uygulanması sonrası 100°C'deki etüvde 30 dak. bekletilmiş ve ninhidrin çözeltine daldırılmıştır. Plaka yüzeyi henüz ıslakken 5

dak. amonyak buharına maruz bırakılmış ve 100°C'deki etüvde 10 dak. bekletilmiştir.

Bu denemelerden elde edilen gözlemler Bölüm 8.1'de belirtilmiştir.

- c) Aspartam floresans indikatörü içermeyen Merck 60 Silika Jel 20×10 cm tabaka üzerine uygulanıp, butanol:asetik asit:su (4:1:1) karışımından oluşan yürütücü faz ile oto yürütücü kullanılarak 70 mm yüksekliğe kadar yürütülmüş ve 110°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir.

Sonrasında CAMAG plaka ısıtıcısı kullanılarak, CAMAG plaka daldırma cihazıyla (Şekil 7.3) 5 sn. ninhidrin çözeltisine daldırılan ince tabaka 90, 100, 110 ve 120°C'ye ayrı ayrı ısıtılarak yaklaşık 3 dak. bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Şekil 8.3'te gösterilmektedir.



Şekil 7.3 CAMAG plaka ısıtıcısı ve plaka daldırma cihazı

7.5.2.3 Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Bölüm 7.5.2'de belirtildiği gibi hazırlanan 10 ppm'lik aspartam çözeltisinden ATS 4 oto örnekleyici kullanılarak Merck 60 Silika Jel 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine sırasıyla 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 µL ve 100 ppm'lik aspartam çözeltisinden sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12 µL hacimlerinde 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulama yapılmıştır.

Sonrasında Bölüm 8.1.1'de belirtilen ön denemeler sonucunda tespit edilen en uygun çalışma şartları uygulanarak, CAMAG WinCATS yazılımında Screening ve Quantitative şeklinde tanımlanan iki moddan Quantitative modu seçeneği ile tabaka 620 nm'de taratılmıştır.

Aspartam konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri (Çizelge 8.1) alınarak elde edilen kromatogram ve densitogram Şekil 8.5 ve Şekil 8.6’da yer almaktadır.

7.5.2.4 Sistem Kesinliği Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Bölüm 7.5.2’de belirtildiği gibi hazırlanan 100 ppm aspartam çözeltisinden ATS 4 oto örnekleyiciyle Merck 60 Silika Jel 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10 µL hacimlerinde 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulama yapılmıştır. Sonrasında 100 ppm aspartam çözeltisinden aynı plaka üzerine 10 defa 5 µL 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulanmış ve Bölüm 8.1.1’de belirtilen çalışma parametreleri izlenerek deney sonlandırılmıştır. Bu çalışmaya ait plakanın görünümü Şekil 8.9’da ve elde edilen sonuçlar Çizelge 8.3’te gösterilmektedir.

Aspartam lekelerinin CAMAG Scanner 3 ile 400-700 nm dalga boyu aralığında absorbands modunda taratılmasıyla spektrumu alınmış ve edilen sonuçlar Şekil 8.10’da gösterilmiştir.

7.5.2.5 Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı, sonuçların standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi ile belirlenmiştir (Eşitlik 7.1 ve 7.2) [39]. Elde edilen değerler Çizelge 8.5’te gösterilmektedir.

$$\text{Tespit edilebilirlik sınırı} = 3,3s/S \quad (\text{Eşitlik 7.1})$$

$$\text{Tayin edilebilirlik sınırı} = 10s/S \quad (\text{Eşitlik 7.2})$$

s= Sonuçların standart sapması (N=10)

S= Kalibrasyon eğrisinin eğimi

7.5.2.6 Doğruluk (% Geri Kazanım) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Çizelge 7.2’de belirtilen aspartamın kullanılabileceği gıdalara benzer, içinde aspartam bulunmayan gerektiğinde öğütücülerle homojen hale getirilen numunelerden 1 mg duyarlılıkta 1 g tartılıp üzerine 10 mg aspartam ilave edilmiştir. Sonrasında 80 ml metanol eklenip 20 dak. 40 °C’deki ultrasonik su banyosunda tutulmuş ve süre sonunda

banyodan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklenmiştir. Oda sıcaklığındaki çözeltiye toplam hacmi 100 ml olacak şekilde metanol ilave edilerek 0,45 µm' lik membran filtreden geçirilip analize hazır hale getirilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan çözeltilerden 5'er µL, Merck 60 Silika Jel 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine 3'er kez oto örnekleyiciyle 7 mm genişliğinde bant şeklinde ve 100 ppm'lik aspartam çözeltisinden aynı plaka üzerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10 µL uygulanmıştır. Bölüm 8.1.1'de belirtilen çalışma parametreleri izlenerek deney sonlandırılmış ve tespit edilen sonuçlar Çizelge 8.6'da gösterilmektedir.

7.5.2.7 Aspartam Lekelerinin Kararlı Tutulmaları ve Daha Belirgin Hale Getirilmeleri İçin Yapılan Çalışmalar

1 ml sulu doymuş bakır (II) nitrat çözeltisi alınıp üzerine 0,2 mL % 10'luk nitrat asidi ilave edilmiş, toplam hacmi 100 mL olana dek % 95'lik etanol ilavesiyle daldırma reaktifi hazırlanmıştır.

Sonrasında ninhidrin çözeltisiyle türevlendirilen aspartam lekelerinin yer aldığı plaka, CAMAG plaka daldırma cihazıyla 1 sn bakır (II) nitrat çözeltisine daldırılıp, hemen % 25'lik amonyak çözeltisiyle doymuş hale getirilmiş çeker ocak altındaki çift oluklu tanka alınmıştır. Son olarak tanktan alınan plaka CAMAG TLC ısıtıcısı kullanılarak 90°C'de 5 dak. bekletilmiştir.

Aynı işlem bakır (II) nitrat yerine çinko nitrat çözeltisi kullanılarak tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 8.11'de gösterilmektedir.

Ayrıca 7.5.2.4 ve 7.5.2.5 bölümlerinde belirtilen parametreler aynı şekilde plakanın çinko nitrat çözeltisine daldırılması sonrası çalışılmış, bu çalışmaların sonuçları 8.1.6.1 ve 8.1.6.3 bölümlerinde, bu iki çalışmanın karşılaştırılması ise Çizelge 8.10'da yer almaktadır.

7.5.3 Sodyum Sakarin Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

0,1 mg duyarlılıkla 100 mg sakarin tartılıp 100 mL'lik ölçü balonuna aktarılarak 1 g/L tatlandırıcı içeren stok çözelti hazırlanıp ayrı ayrı 1 mL ve 10 ml alınmak suretiyle 100 mL'ye seyreltilerek 10 ng/µL ve 100 ng/µL sakarin içeren çalışma çözeltileri elde edilmiştir.

7.5.3.1 Sodyum Sakarin Lekelerinin Değerlendirilmesi Koşullarının Belirlenmesi

Öncelikle sodyum sakarinin karakterize edilebilmesi ve değerlendirmenin ne suretle yapılacağını tespiti için, silika plaka üzerine 5 µL 100 ppm'lik sodyum sakarin çözeltisi uygulanmıştır. Sakarin uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan silika plaka, absorbans/reflaktans modunda 190-350 nm dalga boyu aralığında 5,0 nm aralıklarla taratılmış ve elde edilen densitogramlar Şekil 8.15 ve Şekil 8.16'da gösterilmektedir.

Oto örnekleyici kullanılarak püskürtme tekniğiyle bant şeklinde 20×10 cm boyutlarındaki cam plaka üzerinde yer alan silika jel bazlı ince tabaka (60 F₂₅₄) üzerine numune uygulanmıştır. Arkasından yürütmenin yapılacağı çift oluklu tank, 10 dak. etilasetat: karbon tetraklorür: asetik asit (3:4:0,5) çözücülerinden oluşan hareketli fazın buharıyla doyurulmuş, ADC 2 oto yürütücü ile hareketli faz plaka üzerinde 70 mm kadar yürütülmüş ve plaka 5 dak. kurutulmuştur.

Kurutulan plaka yüzeyi, CAMAG Scanner kullanılarak 230 nm'de taratılarak [10] elde edilen sonuçlar winCATS yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

7.5.3.2 Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Bölüm 7.5.3'te belirtildiği gibi hazırlanan 10 ppm'lik sakarin çözeltisinden Merck Silika Jel 60 F₂₅₄ 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine sırasıyla 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 µL ve 100 ppm sakarin çözeltisinden sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 µL ATS 4 oto örnekleyici kullanılarak 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulama yapılmıştır.

Sonrasında ön denemeler sonucunda tespit edilen ve yukarıda belirtilen en uygun çalışma şartları uygulanarak, CAMAG WinCATS yazılımında Screening ve Quantitative şeklinde tanımlanan iki moddan Quantitative modu seçeneği ile tabaka 230 nm'de taratılmıştır.

Sakarin miktarı ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri (Çizelge 8.11) alınarak elde edilen kromatogram ve densitogram Şekil 8.17 ve Şekil 8.18'de yer almaktadır.

7.5.3.3 Sistem Kesinliği Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Bölüm 7.5.3'te belirtildiği gibi hazırlanan 100 ppm'lik sakarin çözeltisinden Merck 60 F₂₅₄ Silika Jel 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10 µL

ATS 4 oto örnekleyici kullanılarak 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulama yapılmıştır. Sonrasında 100 ppm'lik sakarin çözeltisinden aynı plaka üzerine 10 defa 5 µL 7 mm genişliğinde bant şeklinde uygulanmış ve Bölüm 8.2.1'de belirtilen çalışma parametreleri izlenerek deney sonlandırılmıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen veriler Çizelge 8.13'te gösterilmektedir.

Sodyum sakarin lekeleri CAMAG Scanner 3 ile 200-700 nm dalga boyu aralığında absorbands modunda taratılmasıyla spektrumu alınmış ve edilen sonuçlar Şekil 8.21'de gösterilmiştir.

7.5.3.4 Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı, Bölüm 7.5.2.5'te belirtildiği gibi elde edilmiş ve sonuçlar Çizelge 8.14'te gösterilmiştir.

7.5.3.5 Doğruluk (% Geri Kazanım) Tespiti İçin Yapılan Çalışmalar

Çizelge 7.2'de belirtilen sakarinin kullanılabileceği gıdalara benzer, içinde sakarin bulunmayan, gerektiğinde öğütücülerle homojen hale getirilen numunelerden 1 mg duyarlılıkta 1 g tartılıp üzerine 10 mg sakarin ilave edilmiştir. Sonrasında 80 ml metanol eklenip 20 dak. 40 °C'deki ultrasonik su banyosunda tutulmuş ve süre sonunda banyodan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklenmiştir. Oda sıcaklığındaki çözeltiye toplam hacmi 100 ml olacak şekilde metanol ilave edilerek 0,45 µm' lik membran filtreden geçirilip analize hazır hale getirilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan çözeltilerden 5'er µL, Merck Silika Jel 60 F₂₅₄ 20×10 cm boyutlarındaki ince tabaka üzerine 3'er kez 7 mm genişliğinde bant şeklinde ve 100 ppm'lik sakarin çözeltisinden aynı plaka üzerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10 µL uygulanmıştır. Bölüm 8.2.1'de belirtilen çalışma parametreleri izlenerek deney sonlandırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 8.15'te gösterilmektedir.

7.5.4 Pekmez ve Üzüm Numunelerinde Şeker (Glikoz, Fruktoz, Sakkaroz) Kompozisyonunun HPLC ile Belirlenmesi

0,1 mg duyarlılıkla 350'şer mg fruktoz ve glikoz tartılıp 50 mL'lik ölçü balonuna aktarılarak 7'şer mg/mL fruktoz ve glikoz içeren stok çözelti ve sonrasında bu çözeltinin 2, 4 ve 8 defa seyreltilmesiyle sırasıyla 3,500, 1,750 ve 0,875 mg/mL fruktoz ve glikoz içeren çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

200, 100 ve 50 µg/mL sakkaroz içeren çalışma çözeltileri ise, 0,1 mg duyarlılıkla 200 mg sakkaroz tartılıp 500 mL'lik ölçü balonuna aktarılarak 400 µg/mL sakkaroz içeren stok çözelti hazırlandıktan sonra bu çözeltinin 2, 4 ve 8 defa seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

10 g pekmez, 20 g üzüm suyu ve öğütülerek homojen hale getirilmiş 10 g kuru üzüm örnekleri tartılmıştır. Sonrasında bu örneklerle 80 ml saf su eklenip 20 dak. 70 °C'deki ultrasonik su banyosunda tutulmuş ve süre sonunda banyodan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklenmiştir. Oda sıcaklığındaki çözeltiye toplam hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ilave edilerek 0,45 µm' lik membran filtreden geçirilip analize hazır hale getirilmiştir [40]. Numunelerin, sakkaroz içeriği doğrudan bu çözelti kullanılarak glikoz ve fruktoz içerikleri hazırlanan bu çözeltinin 10 kat seyreltilmesiyle elde edilen çözeltiden tespit edilmiş ve miktarlar g/100 g cinsinden belirtilmiştir. Kullanılan metotla ilgili çalışma parametreleri Çizelge 7.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 7.6 Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi Amacıyla Uygulanan Metot ve Çalışma Parametreleri

Uygulanan Metot	AOAC 980.13
Hareketli Faz	% 80 Asetonitril: %20 Su
Akış Hızı	1,0 ml/dak
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kullanılan önkolon ve kolon	µBondapak NH ₂ ön kolon ve Waters Karbohidrat Analiz Kolonu (Silika Bazlı Propil Amin Kolon)
Kolon Sıcaklığı	30°C
Detektör	Kırılma İndis (RI) Detektör, Waters 2414

7.5.5 İzotopik Fraksiyonlaşma Tespiti İçin Yapılan Analizler

7.5.5.1 SNIF-NMR® Analiz Yöntemi

Şeker (pancar, şeker kamışı ve mısır şurubunda elde edilen sakkaroz ve invert şeker vb. gibi) içeren maddelerin fermente edilmeleri sonucu oluşan etanol, üründe bulunan ve/veya sonradan başka bir kaynaktan ilave edilen şekerin farklandırılmasında kullanılabilir. Şekerin içindeki döteryum ve meyve suyu içindeki su fermentasyon sonrası I ($\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$), II (CH_3CHDOH), III ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$) ve IV (HOD) şeklinde yeniden düzenlenecektir. (D/H)_I izotopları oranı I nolu molekülü resmeder ve ilave şekerin tespitinde kullanılır. (D/H)_I oranı bitki türüne özgüdür.

OIV-MA-AS311-05 [41] analiz yöntemi uygulanmış ve NMR ile analiz öncesi yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

Numunelerin Şeker İçeriklerinin Tespit Edilmesi

Madde 7.5.4’de belirtilen analiz yöntemi kullanılmıştır.

Numunelerdeki Çözünür Madde Miktarının (Briks) % 12’ye Ayarlanması

Pekmez ve üzüm suyu numunelerinin ilk briks değerleri 20°C’de tespit edilmiş [42] sonrasında 0,6 L briks değeri 12 olacak şekilde saf su ilave edilmiştir.

Öğütülerek homojen hale getirilmiş yaklaşık 110 g kuru üzüm örnekleri üzerine 600 mL saf su ilave edilerek 70 °C’ye ayarlanmış manyetik ısıtıcıda 30 dak bekletilmiş, sonrasında hafif vakum altında adi süzgeç kağıdıyla süzülerek elde edilen berrak çözelti gerektiğinde son briks değeri 12 olacak şekilde saf su ilavesiyle hazırlanmıştır.

Numunelerin Fermentasyonu

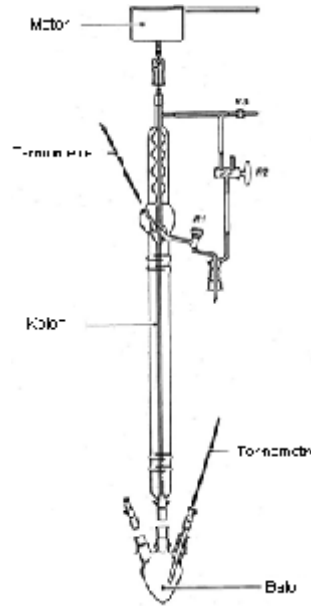
0,6 L briks değeri 12 olan yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan şeker çözeltileri 1 L’lik geniş boyunlu bir erlene alınarak üzerlerine 1,0 g “*Saccharomyces cerevisiae*” kuru maya ve 3,0 g azot bazlı, amino asit içermeyen bakteri mayası ilave edilmiştir. Elde edilecek alkolün buharlaşmasını önlemek için erlenlerin ağızları kapatılmış ancak ortamda oluşacak karbondioksit gazının rahat bir şekilde uzaklaşması içinde kapak üzerine küçük delikler açılarak, 20°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Fermentasyon Kontrolü İçin Numunenin Şeker İçeriğinin Takibi Ve Fermentasyonun Sonlandırılması

Fermente edilen üründen, ilk 12 saat 3 saatte bir, sonrasında 6 saatte bir örnekler alınarak Madde 7.5.4'de belirtilen analiz yöntemi kullanılarak şekerlerin etil alkole dönüşümü takip edilmiştir. 3. günün sonunda tespit edilebilir düzeyde şeker bulunamadığından fermentasyon işlemi sonlandırılmıştır.

Numunenin Fermentasyonu Sonunda Elde Edilen Alkolün Destilasyonu

Fermentasyon sonucu elde edilen etil alkolün destilleme işlemi yaklaşık 1 m uzunluğunda dar bir cam boru içinden geçen spiral teflon bir çubuğun bir motor yardımıyla 2000 devir/dk. hızla dönmesi sonucu elde edilen **Cadiot kolon** ile yapılmıştır (Şekil 7.4). Etanol-su karışımının ayrılabilmesi için 78,0 ile 78,2°C arasındaki sıvı toplanmalı, sıcaklık 78,5°C'yi aştığında destilat musluğu kapatılarak sıcaklık tekrar 78,0 düştüğünde sıvı toplamaya devam edilmelidir. Bu hassasiyeti elde edebilmek amacıyla, destilat musluğu olarak tamamen elektronik bir termovalf kontrolü eklenmiştir.



Şekil 7.4 Cadiot Destilasyon Düzeneği

Destillenen Alkolün Derişiminin Belirlenmesi

Destilleme sonucu elde edilen üründen 0,25 ml alınarak su içeriği Karl Fisher (KF) yöntemiyle % H₂O cinsinden tespit edilmiştir.

Elde edilen Alkolün NMR Analizi İçin Hazırlanması

Elde edilen alkol numunesi 10 mm'lik NMR tüpüne Çizelge 7.7'de belirtilen miktarlar 0,1 mg duyarlılıkla tartıldı.

Çizelge 7.7 NMR tüpünü eklenen madde ve miktarları

Madde Cinsi	Miktar
Etanol Numunesi	3,2 ml
Tetrametil üre (TMU) (İç Standart)	1,3 ml
Hekzaflorobenzen (C ₆ F ₆) (Lock çözücüsü)	150 µL

NMR Spektrometresinin Standardizasyonu ve Test Edilmesi

Öncelikle cihaz manyetik alan homojenliğinin en iyi düzeyde olması için uygun lock ve shimming işlemleri üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Cihaz IRMM'den temin edilen (D/H)_I, (D/H)_{II}, R değerleri belli olan Çizelge 7.8'de belirtilen özelliklere sahip olan üç adet standart etanol çözeltilerinin kullanılmasıyla test edilmiştir.

Çizelge 7.8 NMR Spektrometresinin test edildiği standart etanol çözeltileri ve değerleri

Standart Etanol Çözeltileri			
Parametre	Etanol H	Etanol M	Etanol L
(D/H) _I	$109,65 \times 10^{-6} \pm 0,20 \times 10^{-6}$	$101,69 \times 10^{-6} \pm 0,17 \times 10^{-6}$	$90,30 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6}$
(D/H) _{II}	$119,76 \times 10^{-6} \pm 0,25 \times 10^{-6}$	$130,94 \times 10^{-6} \pm 0,21 \times 10^{-6}$	$122,2 \times 10^{-6} \pm 0,40 \times 10^{-6}$
R	$2,184 \pm 0,005$	$2,575 \pm 0,006$	$2,708 \pm 0,009$

(D/H)_I, (D/H)_{II}, R parametreleri eşitlik 7.3, 7.4 ve 7.5 verilen denklemler yardımıyla hesaplanır.

$$(D/H)_I = 1,5866 \times T_I \times \frac{m_{st}}{m_A} \times \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D} \quad (7.3)$$

$$(D/H)_{II} = 2,3799 \times T_{II} \times \frac{m_{st}}{m_A} \times \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D} \quad (7.4)$$

$$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_I \quad (7.5)$$

Denklemlerde (D/H)_I I (CH₂DCH₂OH) nolu molekülün izotop oranını, (D/H)_{II} II (CH₃CHDOH) nolu molekülün izotopik oranını, m_{st} iç standart olarak kullanılan TMU'nun ağırlığını, m_A etanol örneğinin ağırlığını, t_m^D etil alkol örneğinin derişimi

$(D/H)_{st}$ IRMM'den temin edilen TMU'nun izotop oranını göstermektedir. Göreceli parametre, R ise I ve II moleküllerinin NMR spektrumunda elde edilen pik yüksekliklerinin oranı şeklinde tanımlanır.

NMR Spektrumunun Değerlendirilmesi

NMR cihazının çalıştığı bilgisayardan doğrudan ham verileri alarak başka bir bilgisayarda yüklü SNIF-NMR sisteminin bir parçası olan Eurospec 4.0 yazılımı ile NMR pikleri Lorentzian matematiksel modeli kullanılarak hem eğriler düzeltilmiş hem de hesaplanmıştır. Bu yazılıma aynı zamanda Çizelge 7.7'de belirtilen maddelerin kütleleri ve KF cihazında tespit edilen su içeriği girilerek, yazılımdan otomatik olarak 10 tekrarın sonucu ve her bir parametrenin standart sapma değerleri de elde edilmiştir.

SNIF-NMR Sisteminin Numune Hazırlama Bölümünün Test Edilmesi

SNIF-NMR sisteminde yer alan, pekmez, üzüm, tatlandırıcı ve bunların karışımlarından meydana gelen numunelerin fermantasyonu sonucu elde edilen etanolun destillendiği kolon ve ürünün su içeriğinin tespit edildiği KF cihazı şu şekilde test edilmiştir:

- a. Hacimsel KF ile su içermediği tespit edilen susuz etanol (34923 Sigma-Aldrich) alınarak Çizelge 7.7'de belirtiliği miktarlarda hazırlandı ve standart alkol numuneleri ile valide edilen NMR cihazında analiz edildi.
- b. Aynı susuz etanol numunesinin % 10'luk 300 ml sulu çözeltisi hazırlandı, Şekil 7.4'te gösterilen Cadiot kolon yardımıyla destillendi ve elde edilen ürünün % su içeriği tespit edildi. Sonrasında Çizelge 7.7'de belirtilen miktarlarda hazırlandı ve standart alkol numuneleri ile test edilen NMR cihazında analiz edildi. Elde edilen sonuçlar ve karşılaştırılmaları Çizelge 8.19'dadır.

7.5.5.2 IR-MS ile Yapılan Çalışmalar

Pekmez, üzüm ve tatlandırıcı numunelerinin fermantasyonu sonucu elde edilen ve destillenerek saflaştırılan etanolun $\delta^{13}C$ değerleri (GC-C)-IRMS kullanılarak tespit edilmiştir [43].

Etanol örneği saf su ile 10 kat seyreltilerek doğrudan GC örnekleme kabına alındı. Kullanılan metotla ilgili GC çalışma parametreleri Çizelge 7.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 7.9 IRMS’e bağlı GC’nin çalışma parametreleri

Çözelti Hacmi	0,3 µL
Enjektör sıcaklığı	200°C
Detektör sıcaklığı	220°C
Kapiler kolon	DB-5 ((%5-Fenil)-metilpolisioksan) (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm)
Kolon Sıcaklık Programlaması	100°C 5 dak. bekle 20°C/min 180°C’ye kadar ısıt 180°C’de 2 dak. bekle

Öncelikle numune kolon çıkışı IRMS’e verilmeksizin sadece FID’de analiz edilmiştir. Sonrasında elde edilen kromatograma göre “açık ayırma” arayüzündeki valf 5 sn. süreyle açılarak etanolun tamamının sadece IRMS’e gitmesi sağlanmış ve tekrar valf kapanacak şekilde programlanmıştır.

IR-MS ile Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi

IRMS ile elde edilen sonuçlar $\delta\%$ cinsinden uluslararası V.PDB standardına göre Eşitlik 7.6’ya göre ifade edilir:

$$\delta^{13}C [‰] = (R_{\text{örn}}/R_{\text{standart}} - 1) \times 1000, \text{ eşitlikte } R = {}^{13}C/{}^{12}C \quad (7.6)$$

7.5.5.3 Numunelerin Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etanol Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Her bir etanol örneğinin analizi metotta belirtildiği gibi SNIF-NMR® için 10, (GC-C)-IRMS için 3 defa tekrarlanmıştır.

Çalışmada incelenen pekmez, üzüm ve pekmeze taşış yapmak suretiyle ilave edilebileceği düşünülen tatlandırıcılardan elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerleri sırasıyla, Çizelge 8.20, 8.21 ve 8.22’de gösterilmektedir.

Bölüm 7.4.2 ve 7.4.3’te özellikleri belirtilen kuru üzüm, üzüm suyu ile bu üzüm ve üzüm suyundan elde edilen aynı bölgeye ait pekmez numunelerinin fermentasyonu sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 8.25’te verilmiştir.

Ayrıca Bölüm 7.4.5’te belirtildiği şekliyle kirletilen (taşış yapılan) pekmez örneklerinden elde edilen etanolun analiz sonuçları da Çizelge 8.22’de verilmektedir.

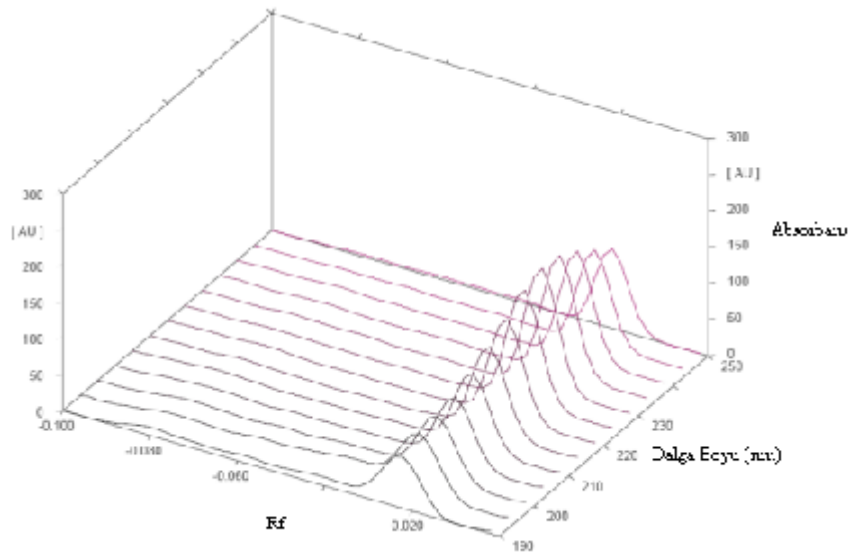
SNIF-NMR® ile belirlenen $(\mathbf{D/H})_t$, ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin birlikte değerlendirilmesi sonuçları bölüm 8.4.5'te belirtilmiştir.

BÖLÜM 8

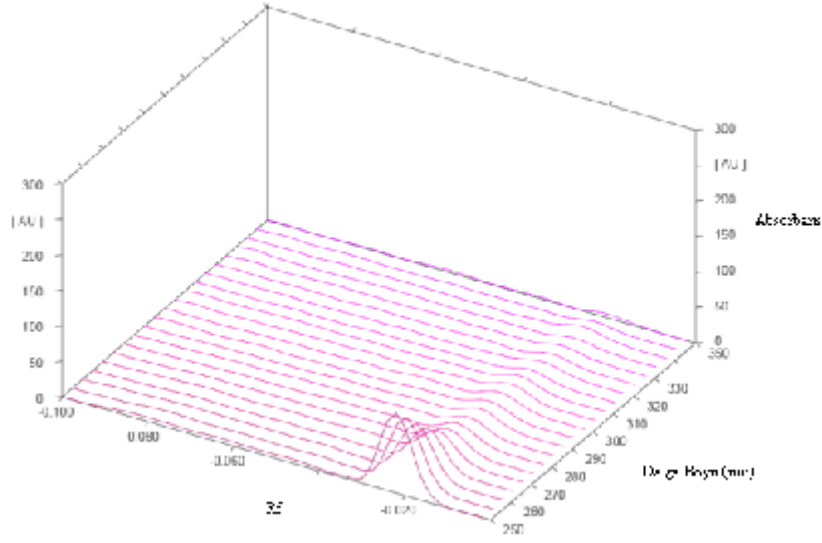
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

8.1 Aspartam Analizi İçin Yapılan Çalışmaların Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Aspartam uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan silika plaka üzerindeki aspartam lekelerinin 190-270 nm dalga boyları arasında absorptans yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 8.1 ve Şekil 8.2).



Şekil 8.1 Yürütülme yapılmaksızın aspartam uygulanan plaka yüzeyinin 190-250 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram



Şekil 8.2 Yürütülme yapılmaksızın aspartam uygulanan plaka yüzeyinin 250-350 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram

Sonrasında plaka üzerine uygulanan aspartam, yürütücü faz ile 70 mm yüksekliğe kadar yürütülmüş ve plaka 110 °C’de etüvde 30 dakika bekletildiğinde elde edilen spektrumda herhangi bir absorbans gözlemlenmemiştir. Ninhidrin çözeltisi plaka yüzeyine püskürtmeyle ve plakanın bu çözeltiliye 3 saniye daldırılması suretiyle uygulanarak etüvde bekletildiğinde; plakanın ninhidrin çözeltinin daldırılması suretiyle daha homojen bir yüzey elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Ancak, plaka zemininde görünür bölgede kızarıklık gözlemlenmiş ve bu zemin kirliliğinden ötürü istenen kromatogram elde edilememiştir.

Zeminde gözlemlenen kızarıklığın giderilmesi amacıyla Bölüm 7.5.2.2’de belirtildiği gibi plaka yüzeyi bazik bir gaz atmosferine maruz bırakıldığında plaka zemindeki kızarıklıkta azalma gözlemlenmiş ancak plaka yüzeyinde ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekeleri tespit edilememiştir.

Lekelerin görünebilmesi amacıyla plaka yüzeyine seyreltik asetik asit püskürtülmüş ve sonuç alınamamıştır. Son olarak plaka yeniden ninhidrin içeren çözeltiliye daldırılmış ve 100°C’ye ayarlanmış etüvde 10 dak. bekletilmiştir. Aspartam lekeleri yine gözlemlenmemiş, sonrasında ısı tabancasıyla plaka yüzeyi yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış, ancak bu uygulama sonucu lekeler gözlemlenmesine rağmen plaka zeminindeki kızarıklık ilk hale göre daha da artmıştır.

Zeminde gözlemlenen kızarıklığın giderilmesi amacıyla Bölüm 7.5.2.2 b) maddesinde belirtildiği gibi ninhidrin çözeltine daldırılan plaka henüz ıslakken bazik bir gaz

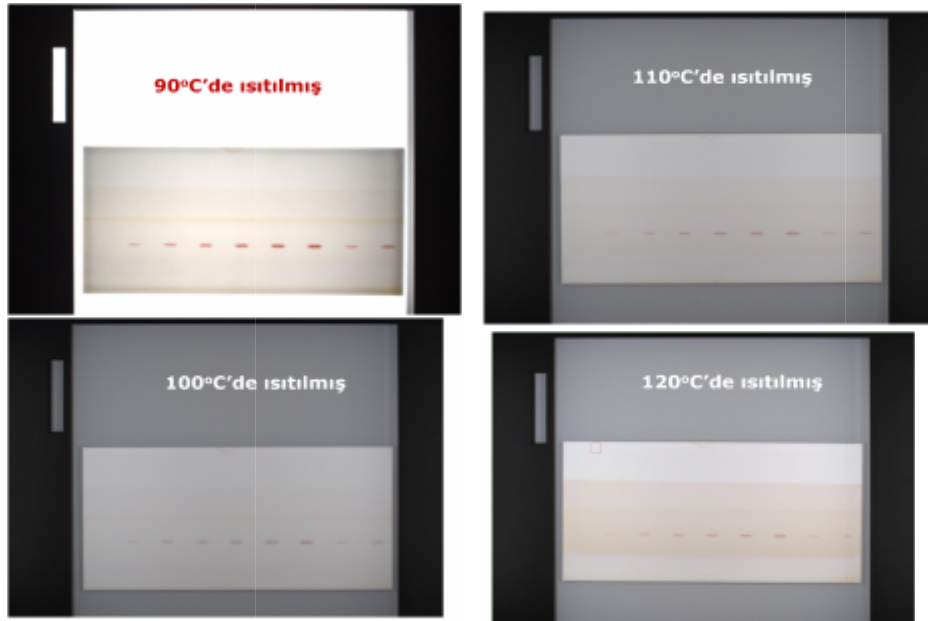
atmosferine maruz bırakılıp kurutulduğunda, aspartam lekeleri yine gözlemlenmiş ancak plaka zeminindeki kızarıklık ilk hale göre daha da artmıştır.

Aspartam uygulaması yapılan silika jel bazlı ince tabaka (60 F₂₅₄) floresans indikatörü içermektedir. Floresans indikatörü içermeyen Merck 60 Silika Jel 20×10 cm plaka üzerine aspartam uygulanarak deney tekrarlandığında belirli bir sıcaklığa kadar kızarıklığın azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 8.3).



Şekil 8.3 Floresan indikatörü içeren (altta) ve içermeyen (üstte) plakaların görünümü.

Ninhidrin çözeltisine daldırılan ince tabakalar 90, 100, 110 ve 120 °C'ye kadar ısıtıldıklarında; 100 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda plaka zemininde kızarıklığın arttığı tespit edilmiştir (Şekil 8.4).



Şekil 8.4 Aynı şartlarda plaka zeminindeki kızarıklığın sıcaklıkla değişimi

8.1.1 Aspartam analizi için tespit edilen en uygun çalışma parametreleri

Aspartam için çalışma şartları ön denemeler sonucunda aşağıdaki gibi tespit edilmiştir:

Metot: Oto örnekleyici ile numune uygulama, arkasından oto yürütücü ile çözücü buharıyla doyurulmuş tankta mobil faz uygulama.

Tabaka: HPTLC Silika Jel Merck 60 20×10 cm

Uygulama: 7 mm genişliğinde band şeklinde püskürtme tekniği

Yürütme: ADC2 kullanılarak otomatik yapılan çalışmanın detayları şöyledir:

- Mobil Faz: n-butanol – asetik asit - su (4:1:1)
- 10 dak. mobil fazla çift oluklu çözücü tank doyurulması
- 70 mm kadar yürütme
- 5 dak. kurutma

Türevlendirme: Plaka, CAMAG Daldırma cihazı kullanılarak 3 saniye % 0,2 ninhidrin (aseton) çözeltine daldırma. Sonrasında, CAMAG TLC Plaka ısıtıcısı kullanılarak 90°C’de 5 dak. bekletme.

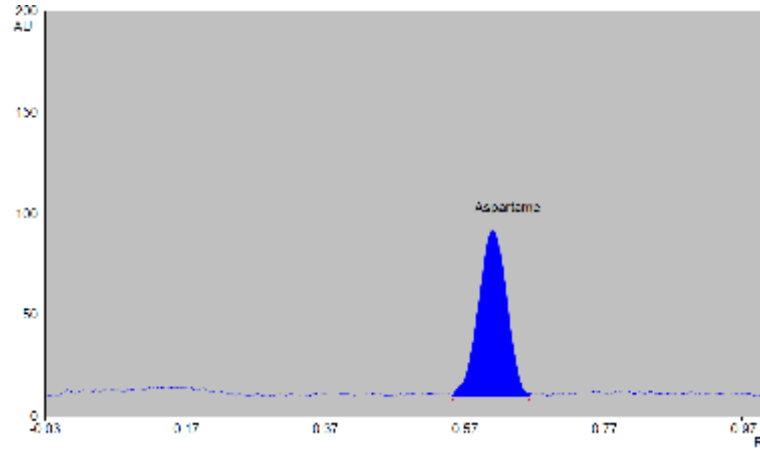
Değerlendirme: CAMAG TLC Scanner kullanılarak 620 nm’de taratma

8.1.2 Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı

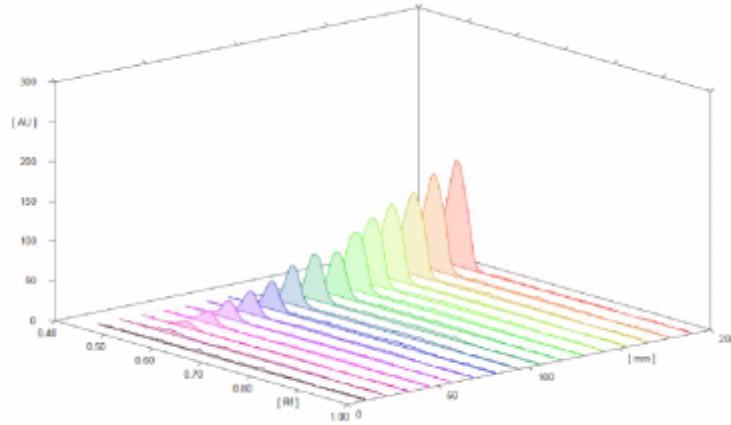
Ön denemeler sonucunda tespit edilen (Bölüm 8.1.1) çalışma şartları altında uygulanan aspartam miktarı konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri (Çizelge 8.1) alınarak elde edilen kromatogram ve densitogram sırasıyla Şekil 8.5 ve Şekil 8.6’da yer almaktadır.

Çizelge 8.1 Aspartam konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri

Aspartam Miktarı (ng)	Pik alanı (mm ²)
60	386,98
80	419,29
100	538,14
150	701,91
200	851,93
400	1271,55
600	1835,46
800	2217,60
1000	2556,28
1200	3069,54



Şekil 8.5 Ön denemeler sonucu elde edilen aspartam kromatogramı



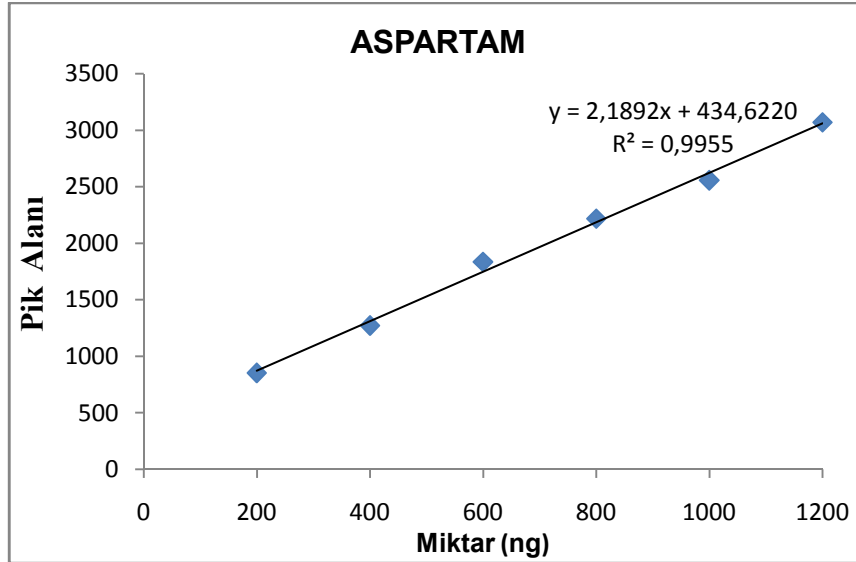
Şekil 8.6 Aspartam uygulanan plaka yüzeyinin absorbands modunda 620 nm’de taratılması sonucu elde edilen densitogram

Her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değeri alınarak sonuçların grafiği çizildiğinde aspartam miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 8.2’de yer almaktadır.

Çizelge 8.2 Aspartam miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri

Aspartam Miktar Aralığı (ng)	Korelasyon Katsayısı
60-1200	$R^2 = 0,9613$
60-1000	$R^2 = 0,9801$
80-1200	$R^2 = 0,9607$
80-1000	$R^2 = 0,9607$
100-1200	$R^2 = 0,9592$
100-1000	$R^2 = 0,982$
150-1200	$R^2 = 0,9618$
150-1000	$R^2 = 0,9883$
200-1200	$R^2 = 0,9955$
200-1000	$R^2 = 0,9942$

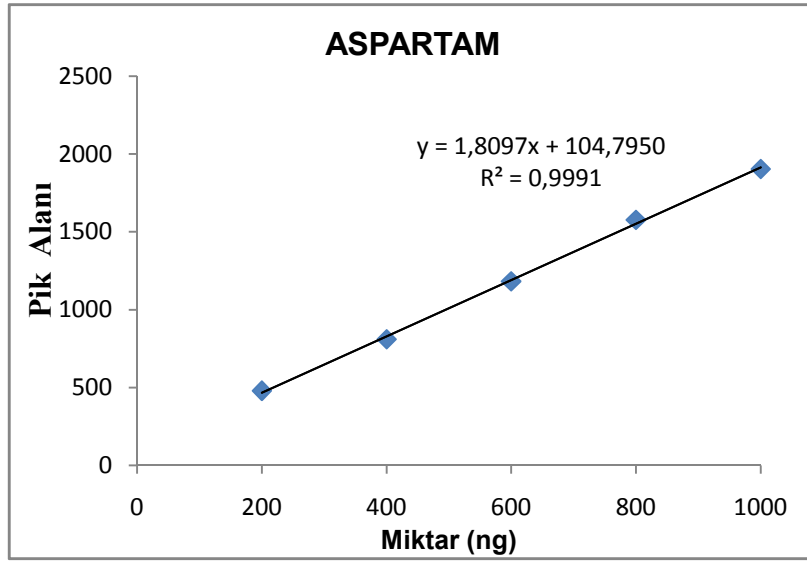
Bu şartlar altında aspartam miktarı ile pik alanı arasındaki doğrusallığın en uygun 200-1200 ng aralığı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8.7).



Şekil 8.7 200-1200 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü

8.1.3 Sistem Kesinliği

200-1000 ng arası aspartam içeren uygulamadan Şekil 8.8'de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, plaka üzerine 10 defa uygulanan ve 500 ng aspartam içeren plakanın görünümü Şekil 8.9'da ve Şekil 8.8'deki kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 8.3'te gösterilmiştir.



Şekil 8.8 200-1000 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü

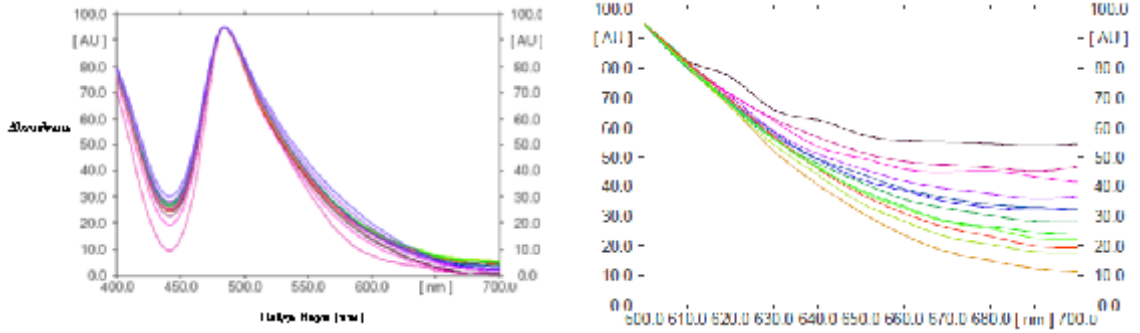


Şekil 8.9 Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin görünümü

Çizelge 8.3 10 adet 500 ng aspartam uygulaması sonucu tespit edilen sonuçlar

Sıra No	Bulunan Aspartam Miktarı (ng)	% Kazanım
1	496,63	99,3
2	478,48	95,7
3	497,92	99,6
4	484,00	96,8
5	510,99	102,2
6	484,40	96,9
7	505,67	101,1
8	514,08	102,8
9	537,12	107,4
10	533,59	106,7
Ortalama	504,29	100,9

Aspartam lekelerinin 400-700 nm dalga boyu aralığında absorbans modunda taratılması sonucu elde edilen spektrum Şekil 8.10'dadır.



Şekil 8.10 Ninhidrinle türevlendirilmiş aspartam lekelerinin 400-700 nm dalga boyu arası spektrumu

Plakanın; 500, 550, 600 ve 620 nm'lerde taratılması sonucu 200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiklerin korelasyon katsayısı değerinin değişimi Çizelge 8.4'de yer almaktadır.

Çizelge 8.4 200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiğin 500-620 nm dalga boyu aralığındaki korelasyon katsayısı değerleri

Dalga Boyu(nm)	500	550	600	620
Korelasyon Katsayısı Değeri	0,98721	0,99708	0,99709	0,9991

8.1.4 Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı)

Şekil 8.8'de gösterilen kalibrasyon eğrisinin eğimi ve Çizelge 8.3'te yer alan okumalardan hesaplanan standart sapma, Eşitlik 7.1 ve 7.2'de yerlerine yazıldığında bulunan değerler Çizelge 8.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 8.5 Aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	20,14
% RSD	3,99
Güven Aralığı*	12,48
LOD (ng)	36,73
LOQ (ng)	111,31

* %95 güven düzeyinde

8.1.5 Doğruluk (% Geri Kazanım)

Bölüm 7.5.2.6’da belirtildiği gibi hazırlanan ve 100 ng/μL aspartam içeren çözeltide elde edilen veriler Çizelge 8.6’dadır.

Çizelge 8.6 Farklı matriks türlerinde aspartamın % geri kazanımı

Matriks	Aspartam Miktarı (ng)					% RSD	% Geri Kazanım	Güven Aralığı*
	Alınan Miktar	Bulunan Miktarlar						
		1	2	3	Ort.			
Şekerli Şurup (Pekmez)	500,00	494,43	469,78	460,80	475,00	3,67	95,0	475,0 ± 19,7
Unlu Mamul	500,00	482,44	468,80	484,70	478,65	1,80	95,7	478,6 ± 9,7
Bebek Maması	500,00	474,92	492,98	464,68	477,53	3,00	95,5	477,5 ± 16,2
Şekerli Çikolata	500,00	491,33	485,40	472,82	483,18	1,96	96,6	477,5 ± 10,7

8.1.6 Aspartam Lekelerinin Belirginleştirilmesi ve Kararlı Hale Getirilmesi

Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekeleri kısa bir süre kararlı halde kalmakta ve plaka üzerindeki rengi solmaktadır. Bu kararlılığın metal iyonlarıyla kompleks oluşturduğunda oldukça arttığı belirtilmektedir [29].

Bölüm 7.5.2.7’de belirtildiği gibi yapılan çalışmada Şekil 8.11’de görüldüğü üzere bakır (II) nitrat çözeltisine daldırılan plaka zemininde belirgin renklenme gözlemlenmiştir. Aynı işlem çinko nitrat çözeltisi ile denendiğinde, bakır (II) nitrate göre zeminde renklenmeye neden olmadığı ve lekelerin daha belirginleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 8.11 Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin çinko nitrat ve bakır (II) nitrat çözeltilerine daldırılması sonucu görünümlerinin karşılaştırılması

Temin edilen kadmiyum nitrat güvenlik bilgi formunda kanserojenik etki uyarısından ötürü denenmemiştir [44].

8.1.6.1 Çinko Nitrat Çözeltisine Daldırılmış Plakada Sistem Kesinliği

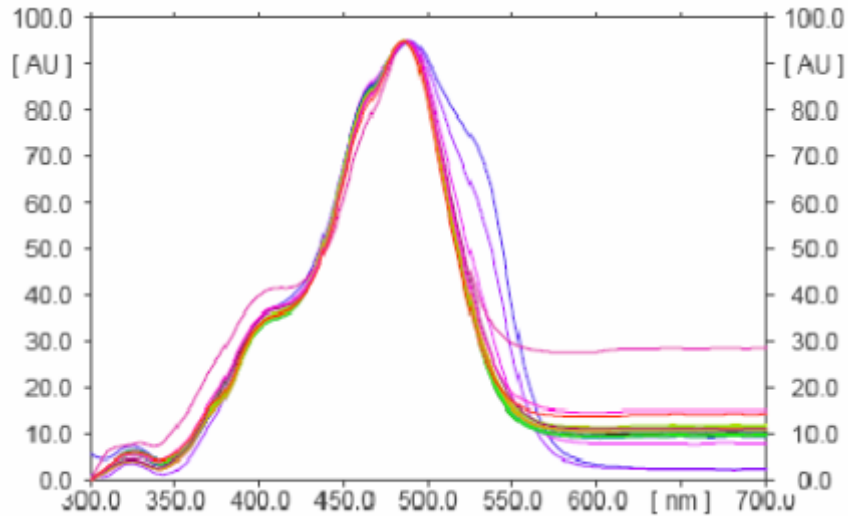
Bölüm 8.1.3'te belirtildiği şekliyle kullanılan plaka, Bölüm 7.5.2.7'de anlatıldığı üzere çinko nitrat çözeltisine daldırıldığındaki plaka görünümü Şekil 8.12'de gösterilmektedir.



Şekil 8.12 Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakadaki aspartam lekelerinin görünümü

8.1.6.2 Çinko Nitrat Çözeltisine Daldırılmış Plakanın Spektrumu

Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakanın 300-700 nm arasında absorbands modunda yapılan taratılma sonucu elde edilen spektrum Şekil 8.13'dedir.



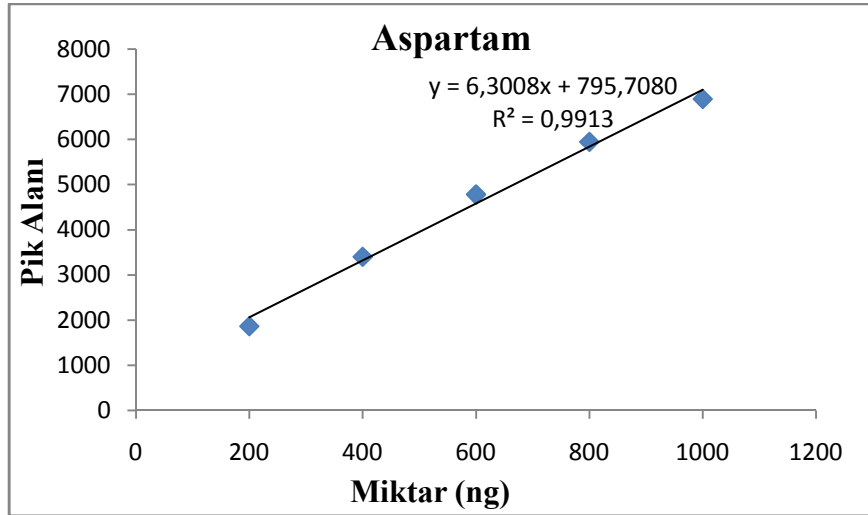
Şekil 8.13 Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakanın 300-700 nm arasında elde edilen spektrum

Plakanın; 400, 450, 480 ve 500 nm’lerde taratılması sonucu 200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiğin korelasyon katsayısı değerinin değişimi Çizelge 8.7’de yer almaktadır.

Çizelge 8.7 200-1000 ng arası aspartam içeren lekelerin miktarı ile pik alanını ilişkilendiren grafiğin korelasyon katsayısı değerinin değişimi

Dalga Boyu(nm)	400	600	800	1000
Korelasyon Katsayısı Değeri	0,991	0,977	0,956	0,959

Şekil 8.12’de görülen çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakanın taraması en iyi korelasyon katsayısının elde edildiği 400 nm’de yapılmış ve Şekil 8.14’te görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu eğrinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 8.8’de gösterilmiştir.



Şekil 8.14 Çinko nitrat çözeltisine daldırılmış plakada 200-1000 ng aspartam ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü

Çizelge 8.8 10 adet 500 ng aspartam uygulanması yapılan ve çinko nitrat çözeltisine daldırılan çalışmada tespit edilen miktar ve % geri kazanım değerleri

Sıra No	Bulunan Aspartam Miktarı(ng)	% Geri Kazanım
1	504,49	100,9
2	493,88	98,8
3	496,19	99,2
4	482,33	96,5
5	497,02	99,4
6	488,57	97,7
7	497,80	99,6
8	495,23	99,0
9	514,28	102,9
10	515,24	103,0
Ortalama	498,50	99,7

8.1.6.3 Çinko Nitrat Çözeltilisine Daldırılmış Plakada Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı)

Şekil 8.14'te gösterilen kalibrasyon eğrisinin eğimi ve Çizelge 8.8'de yer alan okumalardan hesaplanan standart sapma, Eşitlik 7.1 ve 7.2'de yerlerine yazıldığında bulunan değerler Çizelge 8.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 8.9 Çinko nitrat çözeltisine daldırılan plakadaki aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	10,36
% RSD	2,08
GÜVEN ARALIĞI*	6,42
LOD (ng)	5,42
LOQ (ng)	16,44

* % 95 güven düzeyi

Ninhidrinle türevlendirilerek 620 nm'de taratılma sonucu ile aynı plakanın ninhidrinle türevlendirme sonrası çinko nitrat çözeltisine daldırılması ve 400 nm'de yapılan taratılma sonuçlarının karşılaştırılması Çizelge 8.10'dadır.

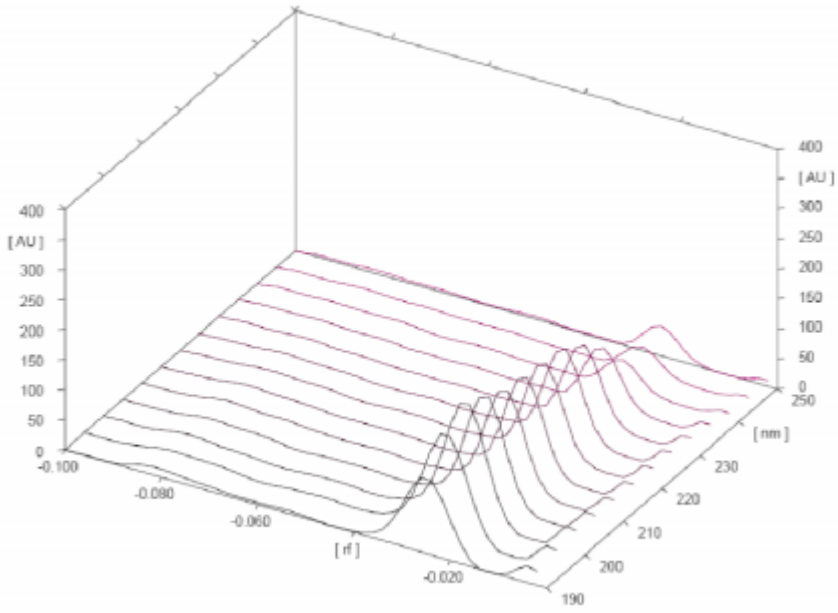
Çizelge 8.10 Ninhidrinle türevlendirilerek 620 nm'de taratılma sonucu ile aynı plakanın ninhidrinle türevlendirme sonrası çinko nitrat çözeltisine daldırılması ve 400 nm'de yapılan taratılma sonuçlarının karşılaştırılması

Parametre	Bulunan Değer	
	Ninhidrinle türevlendirme-620 nm'de tarama	Çinko Nitrat çözeltisine daldırma-400 nm'de tarama
SD	20,14	10,36
% RSD	3,99	2,08
GÜVEN ARALIĞI*	12,48	6,42
LOD (ng)	36,73	5,42
LOQ (ng)	111,31	16,44

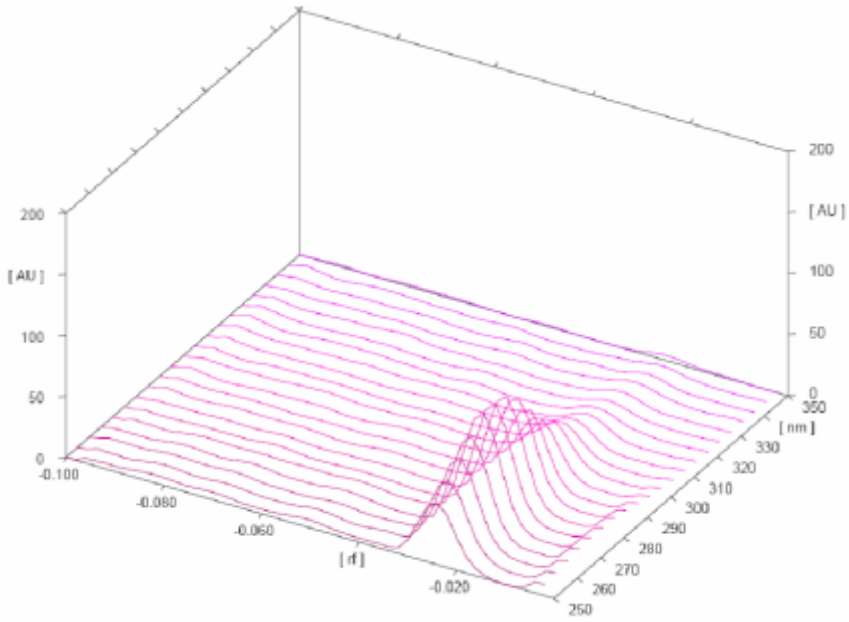
* % 95 güven düzeyi

8.2 Sodyum Sakarin Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

Sodyum sakarin uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan silika plaka üzerindeki sakarinin 190-270 nm dalga boyları arasında absorbanı yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 8.15 ve 8.16).



Şekil 8.15 Yürütülme yapılmaksızın sakarin uygulanan plakanın yüzeyinin 190-250 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram



Şekil 8.16 Yürütülme yapılmaksızın sakarin uygulanan plakanın yüzeyinin 250-350 nm arasında taratılması sonucu elde edilen densitogram

8.2.1 Sodyum Sakarin Analizi İçin Belirlenen Çalışma Parametreleri

Sodyum sakarin için çalışma şartları ön denemeler sonucunda aşağıdaki gibi tespit edilmiştir:

Metot: Oto örnekleyici ile numune uygulama, arkasından oto yürütücü ile çözücü buharıyla doyurulmuş tankta mobil faz uygulama.

Tabaka: HPTLC Silika Jel Merck 60 F₂₅₄ 20×10 cm

Uygulama: 7 mm genişliğinde band şeklinde püskürtme tekniği

Yürütme: ADC2 kullanılarak otomatik yapılan çalışmanın detayları şöyledir:

- Mobil Faz: Etil Asetat:Karbon Tetraklorür:Asetik asit (3:4:0,5)
- 10 dak. Mobil fazla çift oluklu çözücü tank doyurulması
- 70 mm kadar yürütme
- 5 dak. Kurutma

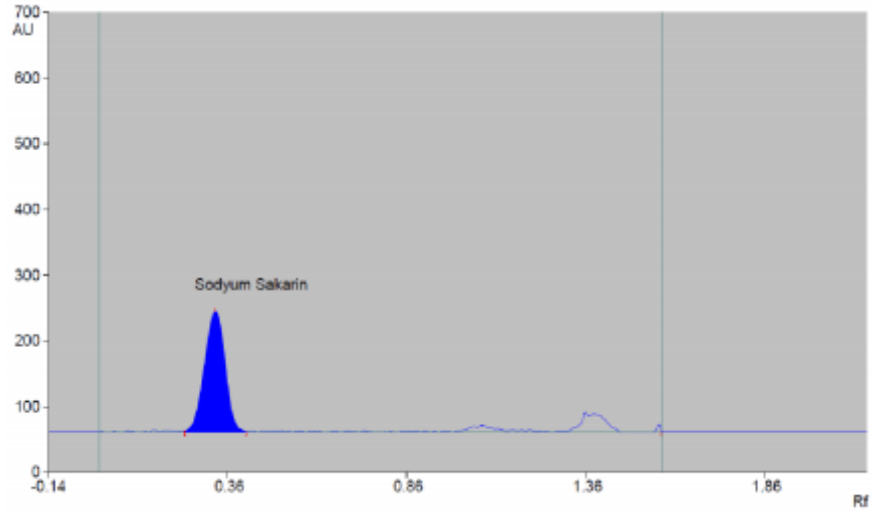
Değerlendirme: TLC Scanner kullanılarak 230 nm’de taratma

8.2.2 Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı

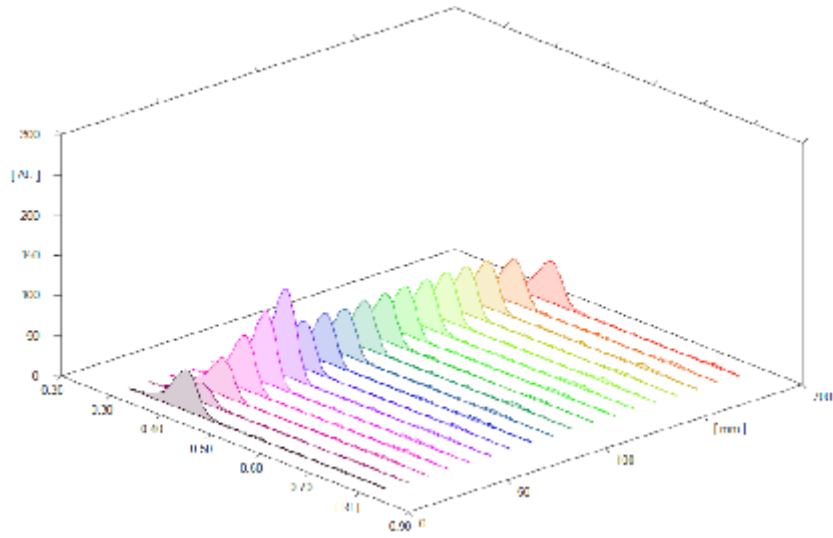
Ön denemeler sonucunda tespit edilen (Bölüm 8.2.1) çalışma şartları altında uygulanan sakarin miktarı konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri (Çizelge 8.11) alınarak elde edilen kromatogram ve densitogram sırasıyla Şekil 8.17 ve Şekil 8.18’de yer almaktadır.

Çizelge 8.11 Sakarin konsantrasyonu ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri

Sakarin Miktarı (ng)	Pik alanı (mm ²)
50	246,64
60	265,20
80	353,27
100	417,78
150	663,34
200	873,54
400	1679,32
600	2401,74
800	3047,32
1000	3654,18
1200	4306,81
1400	4724,52



Şekil 8.17 Ön denemeler sonucu elde edilen sodyum sakarin kromatogramı



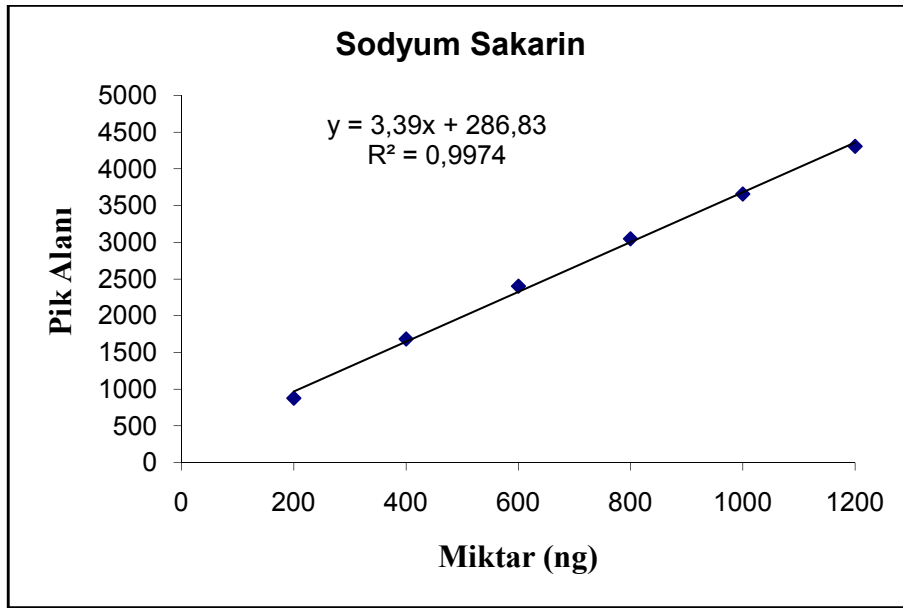
Şekil 8.18 Plaka yüzeyinin adsorbans modunda 230 nm’de taratılması sonucu elde edilen densitogram

Her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değeri alınarak sonuçların grafiği çizildiğinde sakarin miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 8.12’de yer almaktadır.

Çizelge 8.12 Sakarin miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri

Sakarin Miktar Aralığı (ng)	Korelasyon Katsayısı
50-1400	$R^2 = 0,9942$
50-1200	$R^2 = 0,9937$
60-1400	$R^2 = 0,9964$
60-1200	$R^2 = 0,9965$
80-1400	$R^2 = 0,9941$
80-1200	$R^2 = 0,9970$
100-1400	$R^2 = 0,9940$
100-1200	$R^2 = 0,9971$
150-1400	$R^2 = 0,9937$
150-1200	$R^2 = 0,9971$
200-1400	$R^2 = 0,9934$
200-1200	$R^2 = 0,9974$

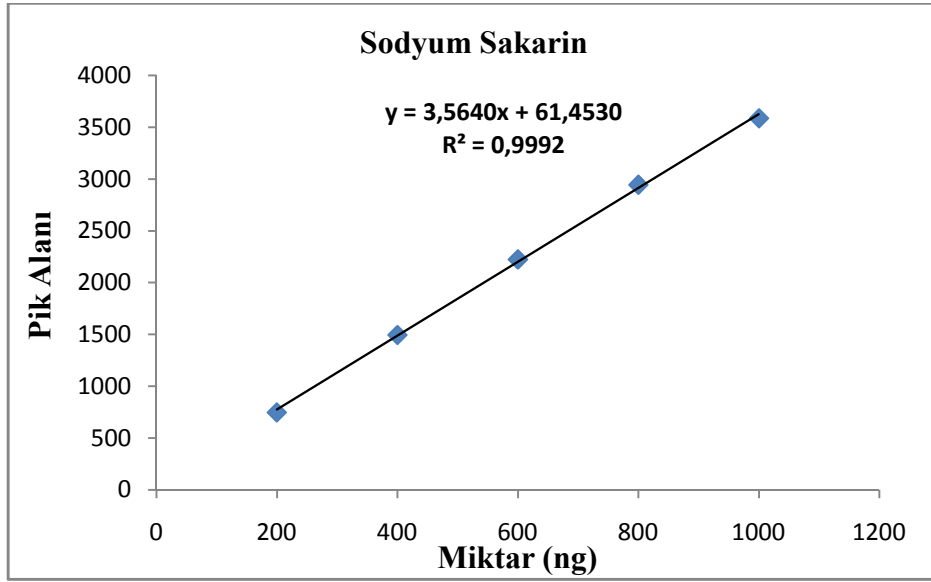
Bu şartlar altında sakarin miktarı ile pik alanı arasındaki doğrusallığın en uygun 200-1200 ng aralığı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8.19).



Şekil 8.19 200-1200 ng sodyum sakarin ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü

8.2.3 Sistem Kesinliği

200-1000 ng arası sakarin içeren uygulamadan Şekil 8.20’de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, plaka üzerine 10 defa uygulanan ve 500 ng sakarin içeren lekelerin bu eğrinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçları Çizelge 8.13’te gösterilmiştir.

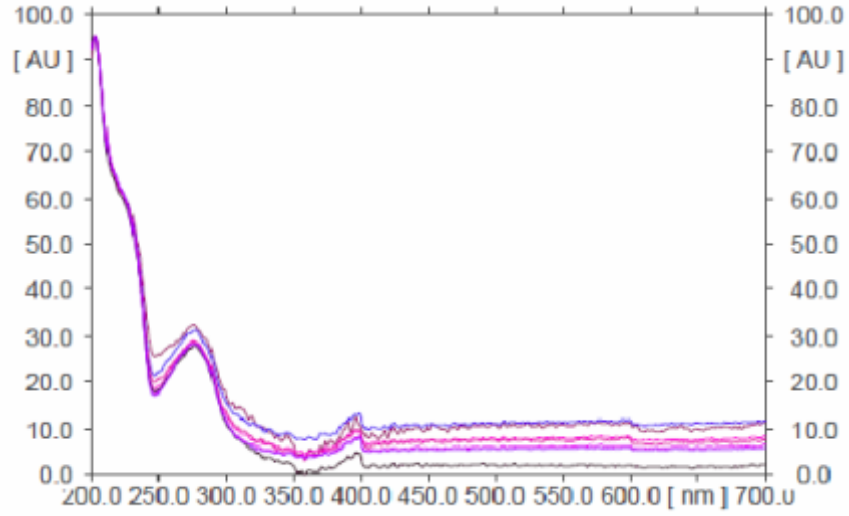


Şekil 8.20 200-1000 ng arası sakarin ile pik alanı arasındaki doğrusallığın görünümü

Çizelge 8.13 10 adet 500 ng sakarin uygulanması sonucu elde edilen % miktar değerleri

Sıra No	Bulunan Sakarin Miktarı (ng)	% Kazanım
1	513,65	102,7
2	499,56	99,9
3	500,56	100,1
4	506,56	101,3
5	510,87	102,2
6	502,50	100,5
7	494,85	99,0
8	505,94	101,2
9	490,50	98,1
10	482,31	96,5
Ortalama	500,73	100,1

Sodyum sakarin lekelerinin 200-700 nm dalga boyu aralığında absorbands modunda taratılmasıyla elde edilen spektrumu Şekil 8.21’de gösterilmiştir.



Şekil 8.21 Sakarin lekelerinin 200-700 nm dalga boyu arası spektrumu

8.2.4 Tespit Edilebilirlik ve Tayin edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis Sınırı ve Kantitatif Tayin Sınırı)

Şekil 8.20’de gösterilen kalibrasyon eğrisinin eğimi ve Çizelge 8.13’te yer alan okumalardan hesaplanan standart sapma, Eşitlik 7.1 ve 7.2’de yerlerine yazıldığında bulunan değerler Çizelge 8.14’de gösterilmektedir.

Çizelge 8.14 Sakarin için tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	9,51
% RSD	1,90
Güven Aralığı*	5,90
LOD	8,81
LOQ	26,68

* % 95 güven düzeyi

8.2.5 Doğruluk (% Geri Kazanım)

Bölüm 7.5.3.5’te belirtildiği gibi hazırlanan ve 100 ng/μL sakarin içeren çözeltide elde edilen veriler Çizelge 8.15’tedir.

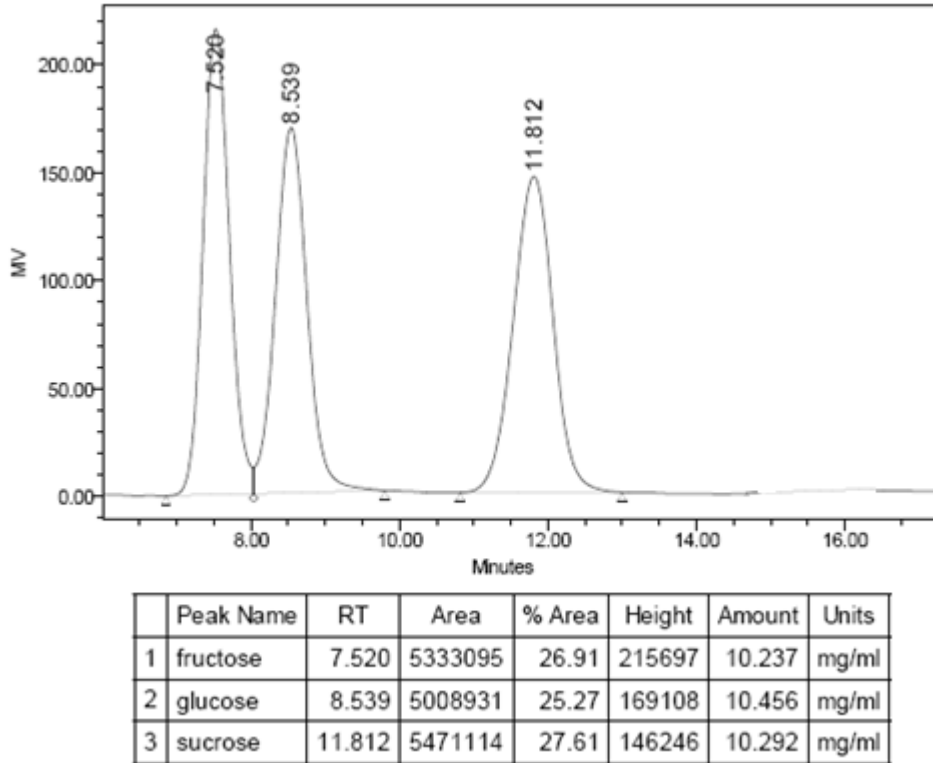
Çizelge 8.15 Farklı matriks türlerinde sakarinin % geri kazanımı

Matriks	Sakarin Miktarı(ng)					% RSD	% Geri Kazanım	Güven Aralığı*
	Alınan Miktar	Bulunan Miktarlar						
		1	2	3	Ort.			
Şekerli Şurup(Pekmez)	500	553,21	547,84	515,16	538,74	3,82	107,7	538,7 ± 23,3
Unlu Mamul	500	501,04	486,43	499,20	495,56	1,61	99,1	495,6 ± 9,0
Bebek Maması	500	546,72	547,35	514,26	536,11	3,53	107,2	536,1 ± 21,4
Şekerli Çikolata	500	506,58	489,00	491,87	495,82	1,90	99,2	495,8 ± 10,7

* % 95 güven düzeyi

8.3 Pekmez ve Üzüm Numunelerinde Belirlenen Şeker (Glukoz, Fruktoz, Sakkaroz) Değerleri

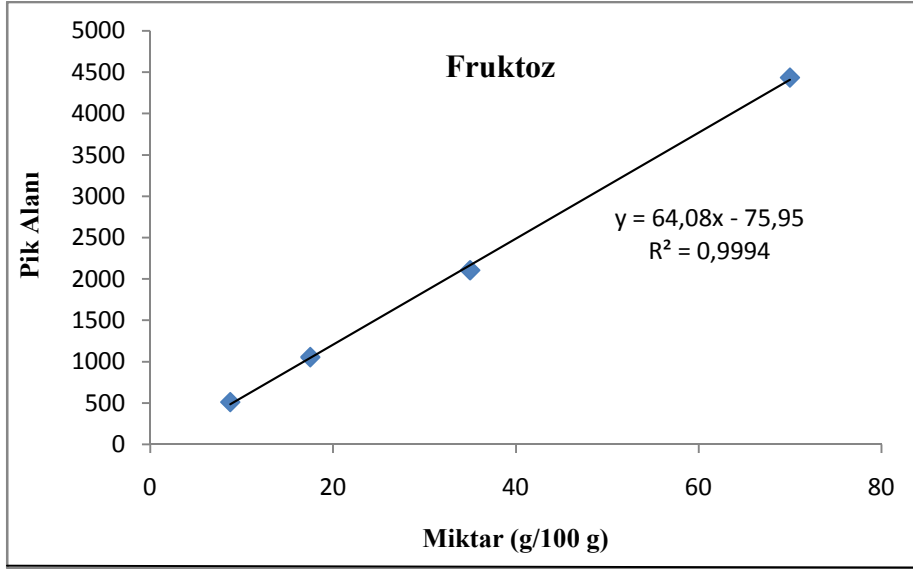
Standart fruktoz, glikoz ve sakkaroz çözeltilerinin, Çizelge 7.6'da görülen çalışma şartları altında enjekte edilmesi ile alınan kromatogram Şekil 8.22'de gösterilmektedir.



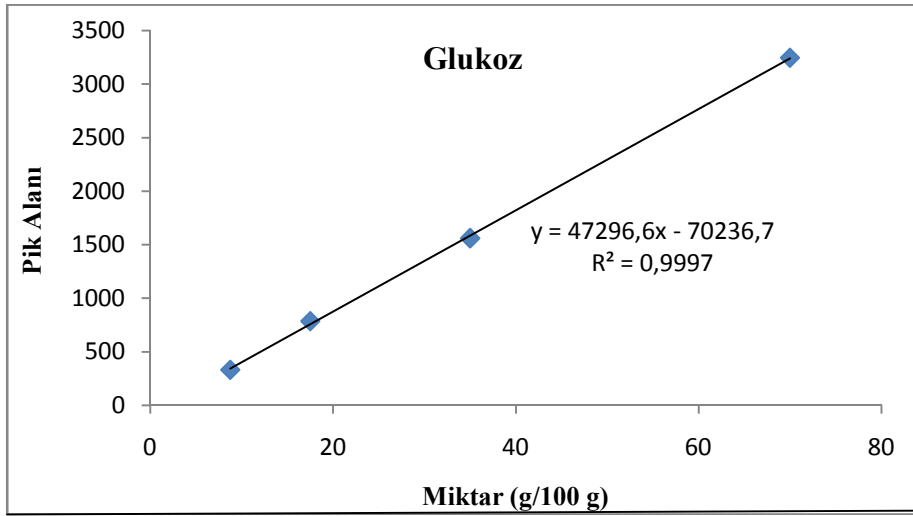
Şekil 8.22 Standart şeker çözeltilerinin kromatogramı

Bölüm 7.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanan 8,75-70,00 g/100 g aralığında fruktoz, glukoz ve 0,25-2,00 g/100 g sakkaroz standartları içeren sulu çözeltilerden her bir

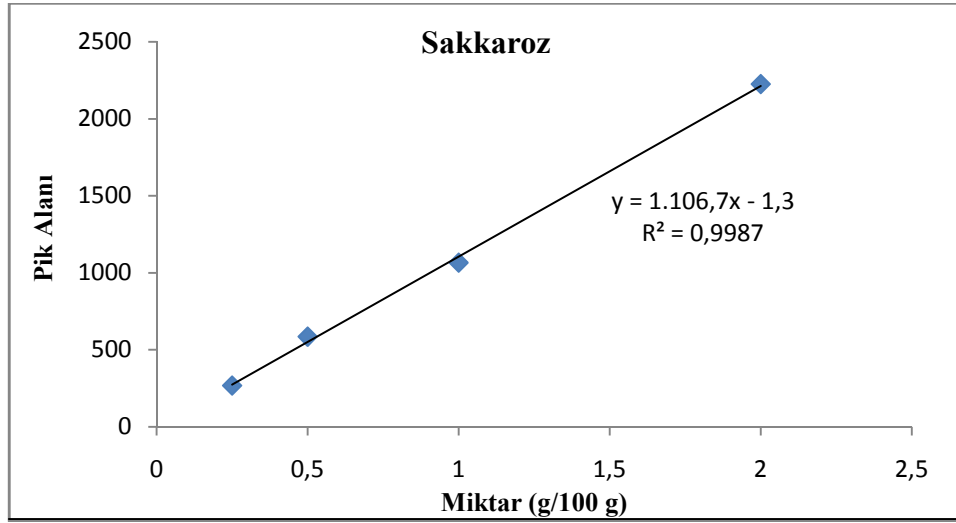
konsantrasyona karşılık gelen alan değeri alınarak elde edilen sonuçların grafiği Şekil 8.23, 8.24 ve 8.25’dedir.



Şekil 8.23 Fruktoz için kalibrasyon eğrisi



Şekil 8.24 Glukoz için kalibrasyon eğrisi



Şekil 8.25 Sakkaroz için kalibrasyon eğrisi

8.3.1 Pekmez Numunelerinin Sonuçları

Çalışmada incelenen pekmez örneklerinde belirlenen, glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri Çizelge 8.16’da verilmiştir. Her bir numune 5’er defa enjekte edilmiş ve sapma değerleri % 95 güven düzeyinde verilmiştir.

Çizelge 8.16 Pekmez örneklerinde belirlenen glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri

Numune No	Fruktoz (g/ 100 g)	Glukoz (g/ 100 g)	Sakkaroz (g/ 100 g)	Fruktoz/Glikoz
1	26,565± 0,290	33,685 ± 0,572	0,00854± 0,00013	0,789
2	31,812 ± 0,110	32,621 ± 0,218	0,03684 ± 0,00053	0,975
3	32,392± 0,124	31,511± 0,145	0,21997± 0,01267	1,028
4	29,782 ± 0,091	35,005 ± 0,279	0,07100 ± 0,00050	0,856
5	32,924 ± 0,221	37,850 ± 0,360	0,77618 ± 0,00867	0,870
6	29,727 ± 0,045	30,889 ± 0,372	0,07759 ± 0,00958	0,962
7	31,485 ± 0,053	32,071 ± 0,297	0,16972 ± 0,00781	0,982

8.3.2 Üzüm Numunelerinin Sonuçları

Çalışmada incelenen üzüm örneklerinde belirlenen, glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri Çizelge 8.17’de verilmiştir. Her bir numune 5’er defa enjekte edilmiş ve sapma değerleri % 95 güven düzeyinde verilmiştir.

Çizelge 8.17 Üzüm örneklerinde belirlenen glukoz, fruktoz, sakkaroz ve fruktoz/glukoz değerleri

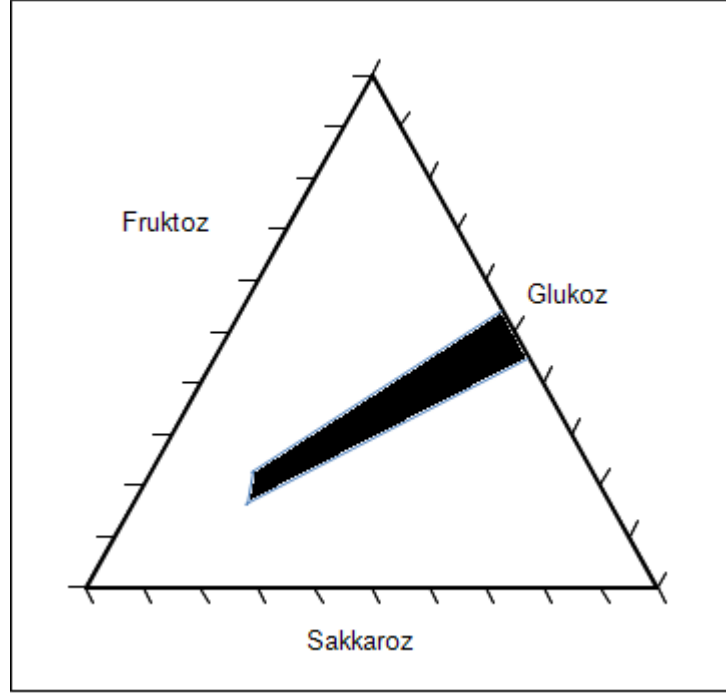
Numune No	Fruktoz (g/ 100 g)	Glukoz (g/ 100 g)	Sakkaroz (g/ 100 g)	Fruktoz/Glikoz
1	30,984 ± 0,222	36,348 ± 0,262	0,03220 ± 0,00028	0,852
2	34,473 ± 0,135	38,647 ± 0,401	0,05223 ± 0,00059	0,892
3	33,464 ± 0,072	33,829 ± 0,072	0,39569 ± 0,00602	0,989
4	34,740 ± 0,153	40,082 ± 0,294	0,03423 ± 0,00027	0,867
5	34,387 ± 0,176	39,122 ± 0,142	0,03849 ± 0,00040	0,879

8.3.3 Belirlenen Şeker (Glukoz, Fruktoz, Sakkaroz) Miktarlarının Üçgen Diyagramı Yardımıyla Değerlendirilmesi

Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi Tebliği’nde [45] sıvı üzüm pekmezinde bulunması gereken fruktoz/glukoz oranı 0,9-1,1 aralığında ve sakkaroz miktarının en fazla % 1 olması gerektiği belirtilmiştir. Bu yaklaşım baz alınarak fruktoz, glukoz ve sakkaroz değerleri Şekil 8.26 ‘da görüldüğü gibi bir üçgen diyagrama geçirilmek üzere grafiğe dönüştürülmüştür. Bu diyagrama veriler şu şekilde geçirilmiştir:

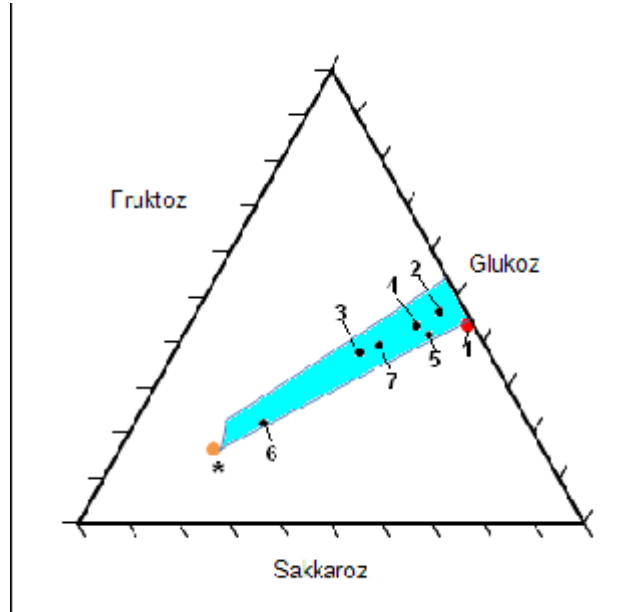
- Numunelerin sakkaroz içerikleri fruktoz ve glikoza oranla çok az olduğundan, sakkaroz değeri 100 ile çarpıldı.
- 100 ile çarpılan sakkaroz, fruktoz ve glikoz değerlerinin toplamı 100 kabul edilerek herbirinin % cinsinden miktarı hesaplandı ve üçgen diyagrama veri olarak girildi.

Bu şekilde yapılan hesaplamalardan elde edilen veriler diyagramda yerleştirildiğinde Şekil 8.26’da görülen taralı bölge fruktoz/glukoz oranı 0,9-1,1 aralığında ve sakkaroz miktarının en fazla % 1,0 olduğu alanı göstermektedir.



Şekil 8.26 Üçgen diyagramında fruktoz/glukoz oranı 0,9-1,1 aralığında ve sakkaroz miktarının en fazla % 1,5 olduğu alan

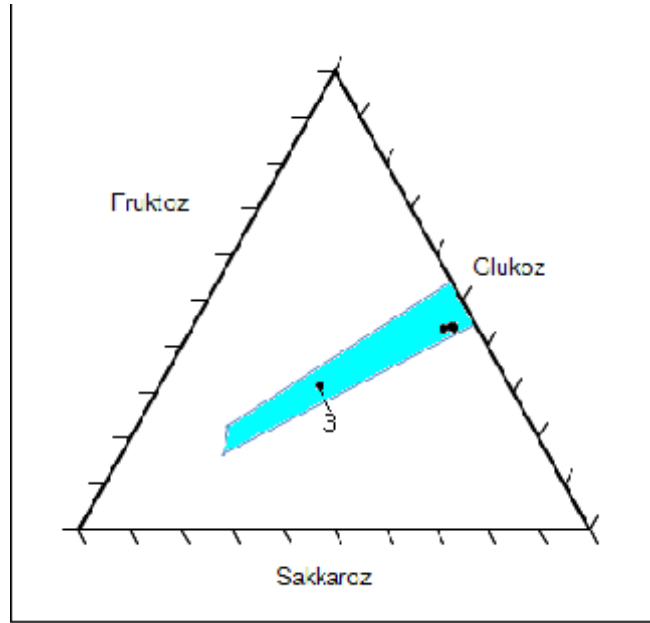
Çizelge 8.16'daki pekmez örneklerine ait veriler diyagrama geçirilmiş ve Şekil 8.27'de görüldüğü üzere numaralandırılmıştır.



Şekil 8.27 Pekmez analiz sonuçlarının ve sakaroz ilavesiyle kirletilen numuneden elde edilen verilerin üçgen diyagramında yerleşimi

Çizelge 8.16'daki sonuçlardan görüldüğü gibi 1 nolu numunenin fruktoz/glukoz oranı 0,789 olarak tespit edilmiş ve Şekil 8.27'teki diyagramda taralı bölgenin dışında yer almıştır. Numunelerin tamamında sakkaroz oranı % 1'in altında tespit edilmiş olup * işaretli nokta 6 nolu örneğe toplam sakkaroz içeriği % 1,6 olacak şekilde sakkaroz ilavesiyle kirletilen numuneyi göstermektedir. Şekil 8.27'te görüldüğü üzere bu nokta taralı bölgenin dışında kalmaktadır.

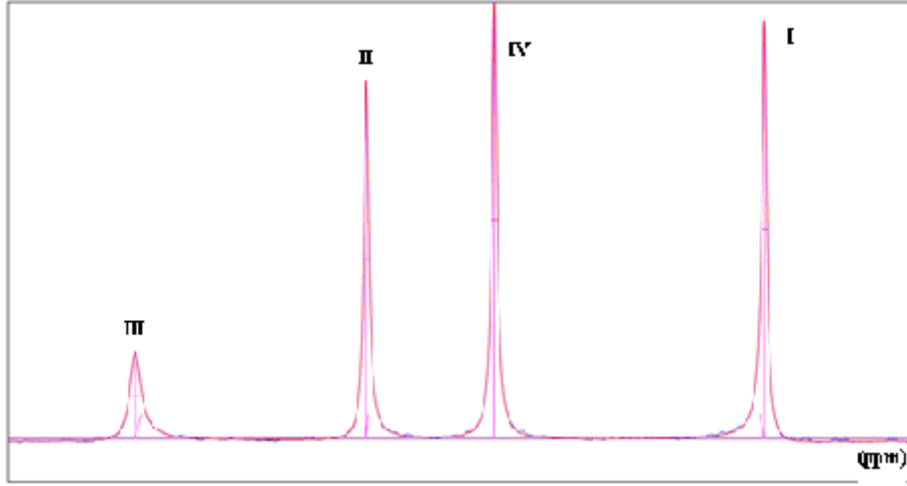
Çizelge 8.17'deki üzüm örneklerine ait veriler Şekil 8.28'teki diyagrama geçirilmiş ve tamamı taralı bölgenin içinde yer almıştır. Sadece 3 nolu ürünün sakkaroz oranı $0,39569 \pm 0,00602$ g/100 g olarak tespit edilmiş ve Şekil 8.28'teki diyagramda görüleceği üzere diğerlerinden farklı bir bölgede yer almıştır.



Şekil 8.28 Üzüm analiz sonuçlarının üçgen diyagramında yerleşimi

8.4 Pekmez ve Üzüm Numunelerinde İzotopik Fraksiyonlaşma Tespiti İçin Yapılan Analiz Sonuçları

Çizelge 7.7'de belirtilen miktarlarda en az hacimce % 96'lık etanol, TMU ve C₆F₆ içeren 10 mm'lik NMR tüpündeki karışımların uygun lock ve shimming işlemleri yapıldığında elde edilen ²H-NMR spektrumu Şekil 8.29'da gösterilmektedir.



Şekil 8.29 Doğal etanolün tipik bir ^2H -NMR spektrumu; standart numuneye ait I, II, III ve IV numaralı sinyallerin ilgili oldukları moleküller sırasıyla şöyledir: $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$, CH_3CHDOH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$, ve Tetrametilüre (TMU).

8.4.1 NMR Spektrometresinin Standardizasyonu ve Test Edilmesi

OIV-MA-AS311-05 [41] metotta belirtildiği üzere NMR ile analize başlamadan önce mutlaka Çizelge 7.8’de belirtilen IRMM’den temin edilen standart etanol çözeltileri ile cihazın test edilmesi gerekmektedir. Test materyallerinin değerleri ile tespit edilen değerler Çizelge 8.18’de belirtilmiştir.

Çizelge 8.18 Test materyallerinin değerleri ve NMR’da tespit edilen değerler

Etanol H		
Parametre	Test Materyal Değeri	Tespit Edilen Değer
$(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$	$109,65 \times 10^{-6} \pm 0,20 \times 10^{-6}$	$109,83 \times 10^{-6} \pm 0,29 \times 10^{-6}$
$(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$	$119,76 \times 10^{-6} \pm 0,25 \times 10^{-6}$	$120,21, \times 10^{-6} \pm 0,38 \times 10^{-6}$
R	$2,184 \pm 0,005$	$2,189 \pm 0,009$
Etanol M		
Parametre	Test Materyal Değeri	Tespit Edilen Değer
$(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$	$101,69 \times 10^{-6} \pm 0,17 \times 10^{-6}$	$101,83 \times 10^{-6} \pm 0,30 \times 10^{-6}$
$(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$	$130,94 \times 10^{-6} \pm 0,21 \times 10^{-6}$	$130,85 \times 10^{-6} \pm 0,53 \times 10^{-6}$
R	$2,575 \pm 0,006$	$2,570 \pm 0,011$
Etanol L		
Parametre	Test Materyal Değeri	Tespit Edilen Değer
$(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$	$90,30 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6}$	$90,52 \times 10^{-6} \pm 0,22 \times 10^{-6}$
$(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$	$122,20 \times 10^{-6} \pm 0,40 \times 10^{-6}$	$122,53 \times 10^{-6} \pm 0,35 \times 10^{-6}$
R	$2,708 \pm 0,009$	$2,707 \pm 0,007$

Test materyellerinin değerleri farklı okunduğunda, analiz tekrarlanmış, uygun sonuçların alınması durumunda numuneler analize tabi tutulmuştur.

8.4.2 SNIF-NMR Sisteminin Numune Hazırlama Bölümünün Test Edilmesi

SNIF-NMR sisteminin en önemli kısımlarında biri numune hazırlık kısmıdır. Özellikle destilasyon kolonu destillenen ürünlerde izotopik fraksiyonlaşmaya sebep olmamalıdır. Bu sebeple, Bölüm 7.5.5.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 8.19’da görölmektedir.

Çizelge 8.19 Susuz etanol ve aynı numunenin % 10’luk sulu çözeltisini destillenmesi sonucu tespit edilen (D/H)_I değerinin karşılaştırılması

Analiz Edilen Numune	% H ₂ O	Tespit Edilen (D/H) _I Değeri
Susuz Etanol	0,00	$92,56 \times 10^{-6} \pm 0,23 \times 10^{-6}$
% 10 Etanol Çözeltisi	7,62	$92,46 \times 10^{-6} \pm 0,24 \times 10^{-6}$

8.4.3 IR-MS ile Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

Elde edilen sonuçlar Eşitlik 7.6 yardımıyla hesaplanır ve otomatik olarak cihaz tarafından yapılmaktadır.

Ayrıca analize başlamadan önce ve analiz sonunda IRMM’den temin edilen ve $\delta^{13}C_{VPDB} = -26.72$ değerine sahip standart etanol (BCR-660) numunesi cihaza 3’er kez enjekte edilerek cihazın kalibrasyonu yapılmıştır.

8.4.4 Numunelerin Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etanol Üzerinde Yapılan Çalışmaların Sonuçları

Bölüm 7.5.5.1’de maddeler halinde belirtilen yöntemlerle pekmez, üzüm ve diğer şeker örneklerinden elde edilen etanol, NMR ve (GC-C)-IRMS ile analize tabi tutulmuş elde edilen analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir:

8.4.4.1 Pekmez Numunelerinin Sonuçları

Çalışmada incelenen pekmez örneklerinden elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen (D/H)_I, (D/H)_{II}, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerleri Çizelge 8.20’de verilmiştir. Her bir numune analizi metotta belirtildiği gibi SNIF-NMR® için 10 ve (GC-C)-IRMS için 3 defa tekrarlanmıştır.

Çizelge 8.20 Pekmez örneklerinden elde edilen etanolde tespit edilen (D/H)_I, (D/H)_{II}, R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri

Numune No	(D/H) _I (ppm)	(D/H) _{II} (ppm)	R	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	98,58 ± 0,32	120,59 ± 0,44	2,446± 0,010	-26,62 ± 0,05
2	104,51 ± 0,58	122,87 ± 0,47	2,351 ± 0,011	-25,98 ± 0,03
3	100,75 ± 0,28	121,60 ± 0,42	2,414 ± 0,012	-24,61 ± 0,08
4	105,89 ± 0,33	125,22 ± 0,50	2,365 ± 0,014	-26,18 ± 0,12
5	101,42 ± 0,29	124,62± 0,56	2,458 ± 0,011	-25,50 ± 0,12
6	103,35 ± 0,37	122,81 ± 0,44	2,377 ± 0,010	-25,62 ± 0,16
7	104,42±0,44	122,21 ± 0,46	2,341 ± 0,014	-27,03 ± 0,13

8.4.4.2 Pekmeze İlave Edilebilecek Tatlandırıcıların Analiz Sonuçları

Bölüm 7.4.4’de özellikleri belirtilen sakkaroz ve şeker çözeltilerinin fermentasyonu sonucu elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen (D/H)_I, (D/H)_{II}, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}\text{C}$ değerleri Çizelge 8.21’de verilmiştir.

Çizelge 8.21 Pekmeze ilave edilebileceği düşünülen tatlandırıcılardan elde edilen etanolde tespit edilen (D/H)_I, (D/H)_{II}, R ve $\delta^{13}\text{C}$ değerleri

Numune No	Numune Cinsi	(D/H) _I (ppm)	(D/H) _{II} (ppm)	R	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	Pancar Şekeri	89,56 ± 0,50	124,78 ± 0,51	2,786± 0,009	-27,26±0,16
2	Isosugar 551	108,15± 0,29	127,38 ± 0,53	2,356 ± 0,010	-9,36± 0,09
3	Isosugar 041	112,19 ± 0,29	124,20 ± 0,40	2,214 ± 0,008	-8,96 ± 0,19
4	Glucoamyl H 361	109,49± 0,50	125,47 ± 0,40	2,292 ± 0,009	-10,26± 0,09

8.4.4.3 Tatlandırıcılarla Karıştırılarak Tağşiş Edilen Pekmez Numunelerinin Analiz Sonuçları

1 ve 4 Nolu Pekmez numuneleri, Bölüm 7.4.5’e belirtildiği üzere % 50 oranında karıştırılarak kirletilen numunelerin fermentasyonundan kazanılan etanolde SNIF-

NMR® ile belirlenen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 8.22’de verilmiştir.

Çizelge 8.22 1 ve 4 nolu pekmezlerin % 50 oranında tatlandırıcılarla karıştırılması sonucu elde edilen etanolde tespit edilen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve $\delta^{13}C$ değerlerinin karşılaştırılması

4 Nolu Pekmez ve Pancar Şekeri Karışımının Değerleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	105,89 ± 0,33	125,22 ± 0,50	2,365 ± 0,014	-26,18 ± 0,12
Pancar Şekeri	89,56 ± 0,50	124,78 ± 0,51	2,786± 0,009	-27,26 ± 0,16
Karışım 1	100,36 ± 0,33	119,21 ± 0,26	2,376 ± 0,007	-26,60 ± 0,08

4 Nolu Pekmez ve Isosugar 041 Karışımının Değerleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	105,89 ± 0,33	125,22 ± 0,50	2,365 ± 0,014	-26,18 ± 0,12
Isosugar 041	112,19 ± 0,29	124,20 ± 0,40	2,214 ± 0,008	-8,96 ± 0,19
Karışım 2	110,60 ± 0,30	124,04 ± 0,57	2,243 ± 0,011	-15,90 ± 0,09

4 Nolu Pekmez ve Glucoamyl H 361 Karışımının Değerleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	105,89 ± 0,33	125,22 ± 0,50	2,365 ± 0,014	-26,18 ± 0,12
Glucoamyl H 361	109,49± 0,50	125,47 ± 0,40	2,292 ± 0,009	-10,26± 0,09
Karışım 3	108,75 ± 0,38	122,97 ± 0,32	2,262 ± 0,008	-18,42 ± 0,10

1 Nolu Pekmez ve Isosugar 551 Karışımının Değerleri				
Numune Cinsi	(D/H)_I (ppm)	(D/H)_{II} (ppm)	R	δ¹³C (‰)
Pekmez	98,58 ± 0,32	120,59 ± 0,44	2,446± 0,010	-26,62 ± 0,05
Isosugar 551	108,15± 0,29	127,38 ± 0,53	2,356 ± 0,010	-9,36± 0,09
Karışım 4	103,10 ± 0,31	125,47 ± 0,40	2,434 ± 0,011	-20,61± 0,11

1 Nolu Pekmez ve Pancar Şekeri Karışımının Değerleri				
Numune Cinsi	(D/H)_I (ppm)	(D/H)_{II} (ppm)	R	δ¹³C (‰)
Pekmez	98,58 ± 0,32	120,59 ± 0,44	2,446± 0,010	-26,62 ± 0,05
Pancar Şekeri	89,56 ± 0,50	124,78 ± 0,51	2,786± 0,009	-27,26 ± 0,16
Karışım 5	96,64± 0,35	121,63 ± 0,45	2,517± 0,013	-26,92± 0,09

Üzüm botanik köken olarak C₃ bitkilerinden (Kalvin-Benson Metabolizması), pekmez örneklerine ilave edilerek kirletilen tatlandırıcılardan, pancar şekeri de C₃ bitkilerinden iken, isosugar 041, glucoamyl H 361, isosugar 551 tatlandırıcıları ise mısırdan elde edilmiş olup C₄ bitkilerindendir (Hatch-Slack Metabolizması) [37].

İlave edilen tatlandırıcıların δ¹³C değerleri; pancar şekeri için -26,62 ± 0,05 ve isosugar 041, glucoamyl H 361, isosugar 551 için sırasıyla -8,96 ± 0,19, -10,26± 0,09, -9,36± 0,09 tespit edilmiştir. Pekmez örneklerinde ise bu değerler 1 nolu pekmez için -26,62 ± 0,05 ve 4 nolu pekmez için -26,18 ± 0,12'dir.

Pancar şekeri ilavesi ile kirletilen 4 nolu pekmez numunesi haricinde diğer taşıyıcı yapılan 3 örneğin δ¹³C değerleri saf pekmez numunelerinden oldukça farklı bulunmuştur.

Diğer taraftan SNIF-NMR analizi sonucu tespit edilen ve etanolun metil bölgesinin izotop oranını veren (D/H)_I değeri bitki türüne özgüdür [41].

İlave edilen tatlandırıcıların (D/H)_I değerleri; pancar şekeri için 89,56 ± 0,50 ve isosugar 041, glucoamyl H 361, isosugar 551 için sırasıyla 112,19 ± 0,29, 109,49± 0,50, 108,15± 0,29 tespit edilmiştir. Pekmez örneklerinde ise bu değerler 1 nolu pekmez için 98,58 ± 0,32 ve 4 nolu pekmez için 105,89 ± 0,33'dür.

Tağış yapılan tüm örneklerin $(D/H)_I$ değerleri saf pekmez numunelerinden oldukça farklı bulunmuştur.

Üzüm ve pancar şekeri C_3 bitkilerinden olduklarından üzüme ilave edilen şeker pancarı saf pekmezin $\delta^{13}C$ değerini kayda değer bir biçimde etkilememektedir. Aslında numuneye ilave edilen şeker pancarı bölüm 8.3'te belirtilen kromatografik analiz sonucu kolaylıkla tespit edilebilir. Ancak, pancar şekeri üzüm şirasına ilave edilmeden veya ilave edildikten sonra invert edilerek fruktoz ve glukoza dönüştürüldü ve fruktoz/glikoz oranı Bölüm 8.3.3'te belirtildiği 0,9-1,1 arasında ayarlandı ise bu ilaveyi kromatografik olarakta tespit etmek mümkün değildir. Bu aşamada SNIF-NMR analizi önem kazanır. Şöyle ki literatürde pancar şekerinin $(D/H)_I$ değeri **89-93** ppm arasında verilmektedir (tespit edilen değer 89,56) [38]. Bu değer üzümün $(D/H)_I$ değerinden oldukça farklıdır ve SNIF-NMR verileri kullanılarak bu taşı tespit edilmiştir. Saf pekmezin kirletilmeden önceki değeri **105,89 $\pm$ 0,33** iken, karıştırıldıktan sonra oldukça farklı bir değer olan **100,36 $\pm$ 0,33** kaymıştır.

Ayrıca metil ve metilen bölgesinin izotop oranlarıyla ilişkili olan **R** (Eşitlik 7.5) değerleri de bu farklılığı ortaya koymaktadır. Şöyle ki; saf pekmez örneklerinin **R** değerine göre pancar şekeri ilavesiyle **R** artmakta, diğer tatlandırıcıların ilavesiyle ise **R** azalmaktadır.

Bazı bitki türlerine ait $(D/H)_I$ ve $\delta^{13}C$ değerleri Çizelge 8.23'te yer almaktadır.

Çizelge 8.23 Bazı bitki türlerine ait $(D/H)_I$ ve $\delta^{13}C$ değerleri [46]

Bitki Adı	$(D/H)_I$ (ppm)	$\delta^{13}C$ (‰)
Şeker pancarı	92,7	-26,6
Patates	96,7	-26,5
Kırmızı meyveler	97,2	-26,6
Arpa	98,2	-24,8
Buğday	99,7	-25,8
Elma	100,9	-25,0
Üzüm	101,8	-26,3
Naranciye	105,0	-26,6
Ananas	108,9	-14,5
Mısır	110,7	-10,4
Kamış şekeri	112,0	-12,2

8.4.4.4 Üzüm Numunelerinin Sonuçları

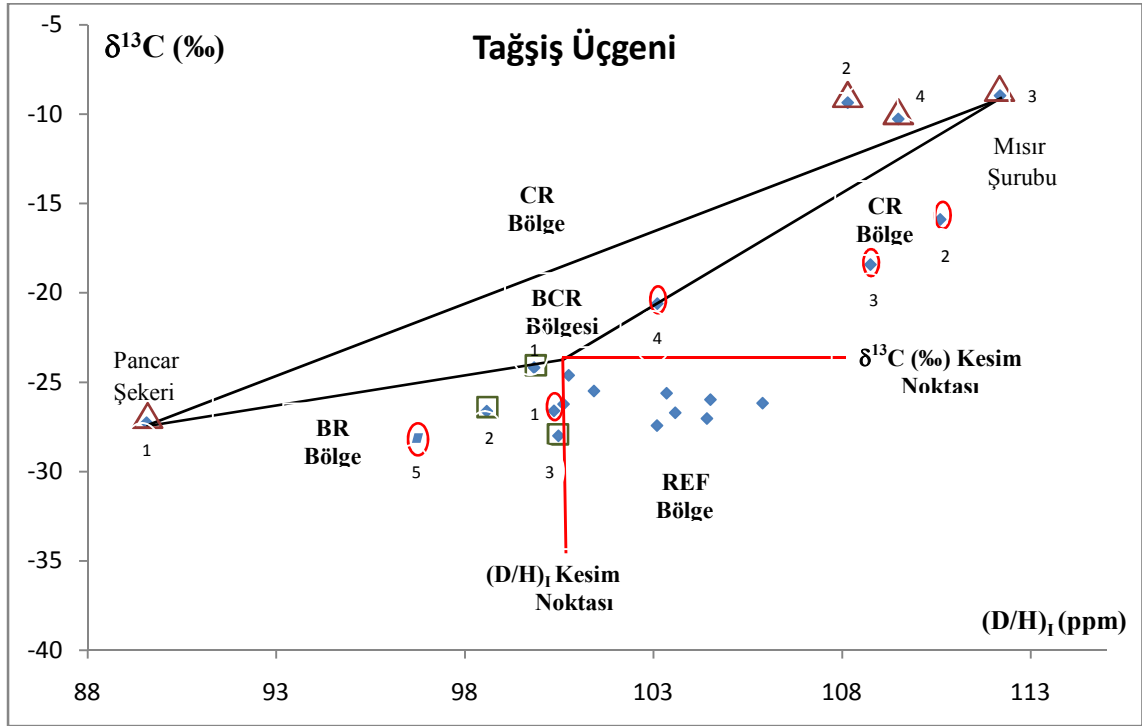
Çalışmada incelenen üzüm örneklerinden elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerleri Çizelge 8.24’te verilmiştir.

Çizelge 8.24 Üzüm örneklerinden elde edilen etanolde tespit edilen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve $\delta^{13}C$ değerleri

Numune No	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
1	100,48 ± 0,44	123,03 ± 0,58	2,449± 0,015	-28,00 ± 0,08
2	103,58± 0,18	119,91 ± 0,32	2,315 ± 0,007	-26,72± 0,03
3	99,84 ± 0,28	120,51 ± 0,42	2,414 ± 0,008	-24,19± 0,15
4	103,09± 0,46	122,18 ± 0,24	2,370 ± 0,012	-27,43 ± 0,11
5	100,62 ± 0,27	122,87 ± 0,65	2,442 ± 0,013	-26,23 ± 0,07

8.4.5 SNIF-NMR® ve IR-MS Analiz Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi

İncelenen üzüm, pekmez, tatlandırıcı ve tatlandırıcılarla kirletilmiş pekmez örneklerinden elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerlerinin bir arada değerlendirilmesinin grafiksel görünümü Şekil 8.30’da yer almaktadır.



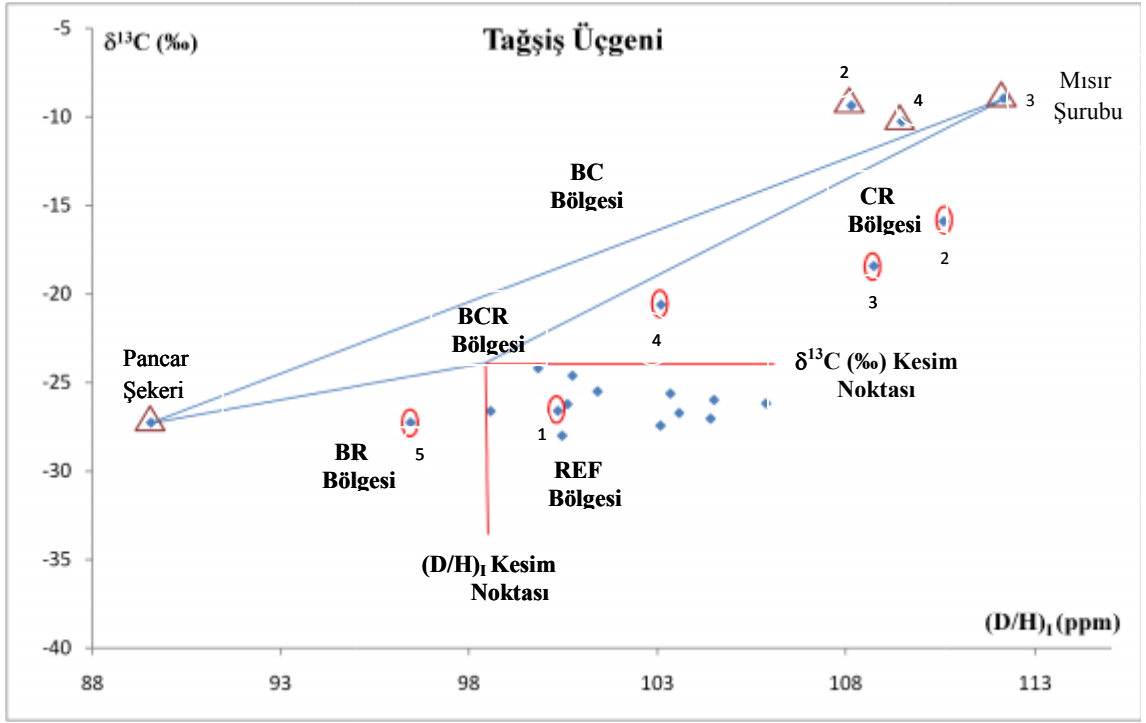
△ Çizelge 8.21’de belirtilen tatlandırıcılar, ○ Çizelge 8.22’de belirtilen karışımlar

□ 3 Nolu üzüm örneği, □ 1 Nolu pekmez örneği, □ 1 Nolu üzüm örneği
1 2 3

Şekil 8.31 Numunelerin fermantasyonu sonucu elde edilen etanolde tespit edilen $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin $(\text{D}/\text{H})_1$ değerleri ile normalize edilmesi.

Şekil 8.31 kullanılarak numunenin grafik üzerine düştüğü pozisyona göre tağşiş olup olmadığı kanısına varılabilir. Tağşişe uğramayan örnek referans bölgesine düşecektir (REF Bölgesi). Şayet numuneye pancar şekeri ilave edilmişse örnek BR, kamış şekeri veya mısır şurubundan elde edilen şeker ilavesi söz konusuysa da CR Bölgesine düşecektir. BCR bölgesi örneğe hem pancar şekeri hem de kamış şekeri veya mısır şurubu şekeri ilave edildiğine delalettir, BC bölgesi ise numuneye yüksek oranda üzümden başka bir meyve suyunun ilave edildiği bölgeyi resmeder.

3 adet örneğin doğası gereği oldukça düşük döteryum ($(\text{D}/\text{H})_1$) içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple bu örnekler REF Bölge dışında kalmıştır. Bu numuneleri de REF bölge içine alacak şekilde tağşiş üçgeni yeniden düzenlendiğinde Şekil 8.32’de görülen grafik elde edilmiştir.



Δ Tatlandırıcılar, ○ Karıştırılmış örnekler, ● Saf pekmez örnekleri

Şekil 8.32 Doğası gereği düşük döteryum içeriğine sahip 1 ve 3 nolu üzüm ve 1 nolu pekmez örneklerinin REF bölgesi içerisine dahil edildiğinde elde edilen tağışış üçgeni.

8.4.5.1 Aynı Bölgedeki Pekmez ve Üzüm Numunelerinin Karşılaştırılması

Bölüm 7.4.2 ve 7.4.3'te özellikleri belirtilen kuru üzüm, üzüm suyu; bu üzüm ve üzüm suyundan elde edilen aynı bölgeye ait pekmez numunelerinin fermentasyonu sonucu elde edilen etanolde SNIF-NMR® ile belirlenen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve (GC-C)-IRMS ile belirlenen $\delta^{13}C$ değerleri Çizelge 8.25'de verilmiştir.

Çizelge 8.25 Çizelge 7.3 ve Çizelge 7.4’de belirtilen aynı bölgeye ait üzüm ve pekmez numunelerinden elde edilen etanolde tespit edilen $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R ve $\delta^{13}C$ değerleri

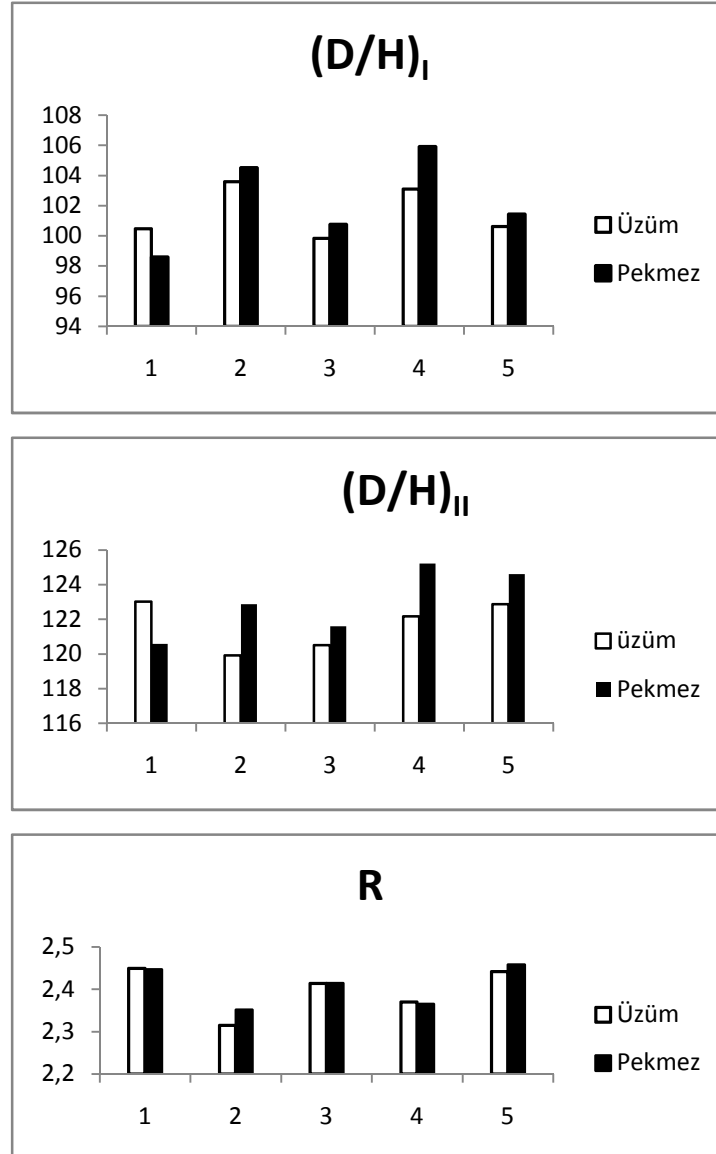
1 Nolu Pekmez ve Üzüm Örnekleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	98,58 ± 0,32	120,59 ± 0,44	2,446± 0,010	-26,62 ± 0,05
Üzüm	100,48 ± 0,44	123,03 ± 0,58	2,449± 0,015	-28,00 ± 0,08
2 Nolu Pekmez ve Üzüm Örnekleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	104,51 ± 0,58	122,87 ± 0,47	2,351 ± 0,011	-25,98 ± 0,03
Üzüm	103,58± 0,18	119,91 ± 0,32	2,315 ± 0,007	-26,72± 0,03
3 Nolu Pekmez ve Üzüm Örnekleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	100,75 ± 0,28	121,60 ± 0,42	2,414 ± 0,012	-24,61 ± 0,08
Üzüm	99,84 ± 0,28	120,51 ± 0,42	2,414 ± 0,008	-24,19± 0,15
4 Nolu Pekmez ve Üzüm Örnekleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	105,89 ± 0,33	125,22 ± 0,50	2,365 ± 0,014	-26,18 ± 0,12
Üzüm	103,09± 0,46	122,18 ± 0,24	2,370 ± 0,012	-27,43 ±0,11
5 Nolu Pekmez ve Üzüm Örnekleri				
Numune Cinsi	$(D/H)_I$ (ppm)	$(D/H)_{II}$ (ppm)	R	$\delta^{13}C$ (‰)
Pekmez	101,42 ± 0,29	124,62± 0,56	2,458 ± 0,011	-25,50 ± 0,12
Üzüm	100,62 ± 0,27	122,87 ± 0,65	2,442± 0,013	-26,23 ± 0,07

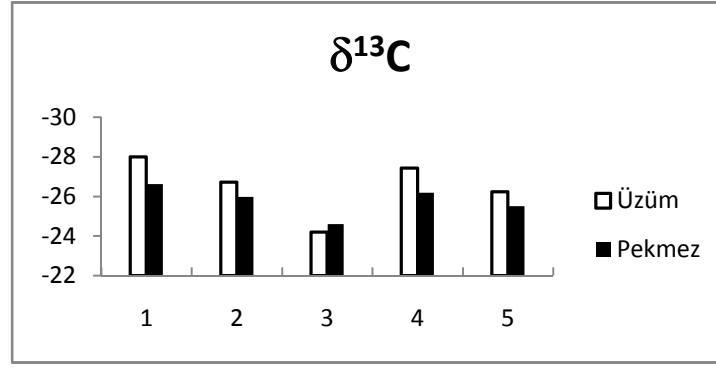
Pekmez örneklerinin $(D/H)_I$ ve $(D/H)_{II}$ değerleri kuru üzüm örneklerinkinden daha büyük, 1 nolu üzüm suyunda ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Pekmez örneklerinin $\delta^{13}C$ değerlerinin ise 3 nolu örnek haricinde daha küçük olduğu

görülmektedir. Bu değerlerin karşılaştırılmasının grafiksel görünümü Şekil 8.25'te görülmektedir.

Guyon vd. [47] çalışmalarında şıranın konsantre edilmesi tekniğinin şarap izotopik parametrelerini nasıl değiştirdiğini incelemiş ve bu tekniklerden yüksek vakum altında konsantre hale getirilen şıranın, konsantre edilmeden önceki $(D/H)_I$ ve $(D/H)_{II}$ değerlerinin kaydeğer bir şekilde yükseldiğini, ancak $\delta^{13}C$ değerlerinin çok fazla etkilenmediği belirtilmektedir.

Bölüm 4.2.2'de belirtildiği gibi pekmez üzüm şırasının ısı yoluyla konsantre edilmesiyle elde edilmektedir ki bu sebeple pekmez örneklerinin $(D/H)_I$ ve $(D/H)_{II}$ değerleri üzüme göre çoğunlukla artış göstermektedir. Aynı bölgede yetiştirilen üzüm ve pekmez numunelerinin $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ ve $\delta^{13}C$ değerlerinin karşılaştırılması Şekil 8.33'tedir.





Şekil 8.33 Aynı bölgede yetiştirilen üzüm ve pekmez numunelerinin (D/H)_I, (D/H)_{II} ve $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin karşılaştırılması.

8.4.6 Pekmez ve Üzüm Numunelerinin Yetiştği Bölgelere Göre Kıyaslanması

Bölüm 6.3'te detaylarıyla anlatıldığı üzere iklimsel faktörlerin izotopik fraksiyonlaşmada özellikle döteryum içeriğinde büyük etkileri vardır. Bu etkiyi incelemek için Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğünden birtakım veriler elde edilmiştir [48]. Öncelikle Zirai Meteoroloji ve İklim Rasatları Dairesi Başkanlığınca hazırlanan **bağ** için filizlenme, çiçeklenme ve oluşum zamanlarını gösterir haritalardan faydalanarak (Ek A) incelenen pekmez ve üzüm örneklerinin bölgelerine göre ayrımı ve bu geçiş tarih aralıkları Çizelge 8.26'da gösterilmektedir. Sonrasında, 1 Nisan-30 Eylül 2010 arasında ortalama sıcaklık (°C), toplam güneşlenme süresi (saat), toplam yağış miktarı (mm) ve ancak belirtilen tarihler arasındaki veriler elde edilebildiği için 1 Mayıs-30 Ekim 2011 arasındaki toplam buharlaşma miktarları (mm) söz konusu genel müdürlük internet sitesinden derlenerek yine incelenen pekmez ve üzüm örneklerinin bölgelerine göre ayrımı bazında Çizelge 8.27'de yer almaktadır. Ayrıca numunelerin yetiştirildiği bölgelerin enlem ve denizden yükseklik (rakım) bilgileri de Çizelge 8.27'de yer almaktadır.

Çizelge 8.26 İncelenen pekmez ve üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgedeki bağların filizlenme, çiçeklenme ve oluşum tarihleri

Numune No	Yetiştigi Bölge ve Yer	Filizlenme Tarih Aralığı	Çiçeklenme Tarih Aralığı	Oluşum Tarih Aralığı
1	Marmara Tekirdağ-Şarköy	15-30 Nisan	25 Mayıs- 9 Haziran	8-28 Ağustos
2	Ege Manisa- Sarıgöl	1-15 Nisan	10-25 Mayıs	29 Haziran- 19 Temmuz
3	İç Anadolu Nevşehir- Gülşehir	1-15 Mayıs	9-24 Haziran	19 Temmuz- 8 Ağustos
4	Güneydoğu Anadolu Kilis	1-15 Nisan	10-25 Mayıs	19 Temmuz- 8 Ağustos
5	İç Anadolu Kayseri-Yeşilhisar	1-15 Mayıs	10-25 Mayıs	19 Temmuz- 8 Ağustos
6	Karadeniz-İç Anadolu (Tokat-Zile)	1-15 Mayıs	25 Mayıs-9 Haziran	8-28 Ağustos
7	Akdeniz Antalya-Akseki	1-15 Nisan	9-24 Haziran	28 Ağustos- 17 Eylül

Çizelge 8.27 Pekmez ve üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgelerin birtakım iklimsel ve coğrafi verileri

Numune No	Yetiştigi Bölge ve Yer	Ortalama Sıcaklık (°C)*	Toplam Güneşlenme Süresi (saat)*	Toplam Yağış Miktarı (mm)*	Toplam Buharlaşma (mm) [†]	Bulunduğu Enlem	Rakım (metre)
1	Marmara Tekirdağ-Şarköy	19,50	48,70	204,80	751-1000	40°36'	6
2	Ege Manisa - Sarıgöl	23,77	56,40	147,80	1001-1250	38°11'	210
3	İç Anadolu Nevşehir- Gülşehir	17,17	59,00	173,60	1001-1250	38°41'4	885
4	Güneydoğu Anadolu Kilis	23,72	60,50	100,30	1501-1750	36°43'	680
5	İç Anadolu Kayseri- Yeşilhisar	17,72	56,10	185,40	1001-1250	38°20'	1150
6	Karadeniz-İç Anadolu (Tokat-Zile)	18,68	48,60	199,90	751-1000	40°17'	710
7	Akdeniz Antalya-Akseki	23,77	62,20	128,60	1001-1250	37° 3'	1050

*1 Nisan-30 Eylül 2010 arası, [†]1 Mayıs-30 Ekim arası

Toplanan bu verilerden iklim ve diğer çevresel faktörlerden faydalanarak bir ayırım yapılmaya çalışılmıştır. Öncelikle, iklim farklılığı açısından **sıcak-kurak**, **sıcak-nemli**, **soğuk-kurak**, **soğuk-nemli** olmak üzere 4 bölgeye ayrılmıştır.

Buharlaştırmanın az olduğu bölgelerde döteryum içeriğinin düşük olacağı, fazla yağış alan (özellikle yağmur) bölgelerde de döteryum oranının yine düşük olduğu belirtilmektedir.

8.4.6.1 Pekmez Numunelerinin Yetiştirdiği Bölgelere Göre Kıyaslanması

(D/H)_{II} değerinin üzümün yetiştirildiği bölgenin klimatolojisinden oldukça fazla ve şıradaki şeker konantrasyonundan çok az etkilendiği belirtilmektedir. İncelenen pekmez örneklerinde tespit edilen (D/H)_{II} ve (D/H)_I değerlerinin yukarıda belirtilen, iklim farklılığı açısından ayrılan ve pekmez örneklerinin yetiştirildiği bölgelerin ilişkisi Çizelge 8.28’de verilmektedir.

Çizelge 8.28 İncelenen pekmez örneklerinin yetiştirildiği bölgeye göre iklimsel bölgeleri ve bu bölgelerin tespit edilen (D/H)_{II} ve (D/H)_I değerleri

İklimsel Bölge	(D/H) _{II} (ppm)	(D/H) _I (ppm)	Yetiştirdiği Bölge ve Yer	Numune No
Sıcak-kurak	125,22	105,89	Güneydoğu Anadolu Kilis	4
Sıcak-nemli	122,87	104,51	Ege Manisa- Sarıgöl	2
	122,21	104,42	Akdeniz Antalya-Akseki	7
Soğuk-kurak	121,60	100,75	İç Anadolu Kayseri-Yeşilhisar	5
	124,62	100,62	İç Anadolu Nevşehir- Gülşehir	3
Soğuk-nemli	120,59	98,58	Marmara Tekirdağ-Şarköy	1
Geçiş *	122,81	103,35	Karadeniz-İç Anadolu (Tokat-Zile)	6

* Karadeniz - İç Anadolu arası iklim tipi

Pekmez numunelerinde tespit edilen (D/H)_{II} değerleri kıyaslandığında beklenildiği gibi, en yüksek değer 125,22 ppm ile sıcak-kurak bir iklime sahip olan Güneydoğu Anadolu Bölgesinde (GDAB) yetiştirilen pekmezde en düşük değer ise 120,59 ppm ile soğuk ve nemli bir iklimde yetişen pekmezde tespit edilmiştir.

GDAB yetişen pekmezi ise sıcak-nemli bir iklimde yetişen pekmez izlemiştir. Soğuk ve kurak bölgede yetişen pekmezin $(D/H)_{II}$ değeri ise soğuk-nemli ve sıcak-nemli iklimlerde yetişen pekmezlerin arasında tespit edilmiştir.

Zile'nin coğrafi bölge olarak Orta Karadeniz Bölgesi'nin güneyi ile İç Anadolu Bölgesi'nin kuzeyinde bir geçit noktasında olması nedeniyle her iki bölgenin de iklim özelliklerini taşımaktadır. Yazlar sıcak ve kurak, kışlar özellikle kar yağışlı ve soğuk geçmekte, yağmurlar ise daha ziyade ilkbahar sonlarına kaymış olmakla birlikte sonbaharın ilk aylarında da görülmektedir. Bu nedenle Zile'de genel olarak Karadeniz - İç Anadolu arası iklim tipi görülmektedir [49]. Bu iklim özelliklerine sahip olan yörede yetiştirilen üzümde ise $(D/H)_{II}$ değeri 122,81 ppm olarak tespit edilmiştir.

Sadece soğuk-kurak bir bölgeden Nevşehir'den temin edilen pekmez örneğinin **124,62 ppm** olan $(D/H)_{II}$, hem kendi bölgesine çok yakın bir bölge olan Yeşilhisar'dan temin edilen pekmezden çok farklı hem de 23,72°C ortalama sıcaklık ve yetiştirildiği tarih aralığında 100,30 mm yağış alan GDAB'ye oldukça yakın bir değerdir. Döteryum içeriği oksijen ile yakinen ilgilidir. Bu sebeple bu pekmez örneğinin kuru üzümde elde edilmiş olabileceği yani pekmez yaparken üzüm şirasının kendi suyundan ziyade dışarıdan su ilavesiyle hazırlanmış olabileceğinden şüphelenilmiştir.

Ayrıca Çizelge 8.28'de görüleceği üzere pekmez örneklerine ait $(D/H)_I$ değerleri de aynı şekilde bu farklılaştırılan iklimsel bölgeyle uyum içindedir.

En yüksek $(D/H)_I$ değeri 105,89 ppm ile GDAB yetiştirilen, en düşük değer ise 98,58 ppm ile soğuk ve nemli bir iklimde yetiştirilen pekmezde tespit edilmiştir. Ege ve Akdeniz bölgelerindeki pekmezlerde bu değer sırasıyla, 104,51 ve 104,42 ppm iken Zile pekmezi 103,35 ppm olarak tespit edilmiştir. İç Anadolu Bölgesindeki Nevşehir ve Kayseri illerinde yetişen pekmezlerde de $(D/H)_I$ değerinin sırasıyla 100,62 ve 100,75 ppm olduğu gözlemlenmiştir.

8.4.6.2 Üzüm Numunelerinin Yetiştği Bölgelere Göre Kıyaslanması

Çizelge 8.29'da görüleceği üzere üzüm örneklerine ait $(D/H)_I$ değerleri pekmez numunelerinde olduğu gibi aynı şekilde farklılaştırılan iklimsel bölgeyle uyum içindedir. Ancak üzüm örneklerinde tespit edilen $(D/H)_{II}$ değerleri arasında benzer ilişkiye raslanılmamıştır.

Çizelge 8.29 İncelenen üzüm suyu ve kuru üzüm örneklerinin yetiştirildiği bölgeye göre iklimsel bölgeleri ve bu bölgelerin tespit edilen $(D/H)_{II}$ ve $(D/H)_I$

İklimsel Bölge	$(D/H)_{II}$ (ppm)	$(D/H)_I$ (ppm)	Yetiştigi Bölge ve Yer	Numune No
Sıcak-kurak	122,18	103,09	Güneydoğu Anadolu Kilis	4
Sıcak-nemli	119,91	103,58	Ege Manisa- Sarıgöl	2
Soğuk-kurak	122,87	100,62	İç Anadolu Kayseri-Yeşilhisar	5
	120,51	99,84	İç Anadolu Nevşehir- Gülşehir	3
Soğuk-nemli	123,03	100,48	Marmara Tekirdağ-Şarköy	1

Yapılan çalışmalardan aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmamızın ilk kısmında yüksek yoğunluklu yapay tatlandırıcılardan aspartam ve sakarinin enstrümantal Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisiyle (YPİTK) nitel ve nicel analizi incelenmiştir. Çalışmamızdaki YPİTK metotları basit, ekonomik bir yöntem olmakla beraber söz konusu metotlarda doğrusalılık, doğrusalılık aralığı, doğruluk (geri kazanım) ve sistem kesinliği parametreleri incelenmiştir. Ayrıca şeker, un ve nişasta, yağ, vitamin, kafein ve teobromin (kakaodan gelen alkaloidler) gibi maddeleri içeren farklı matris türlerinin bulunduğu ortamda ve bu şartlarda metotların spesifik olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu metotlar gıda sanayi için, özellikle iş yoğunluğu yüksek laboratuvarlarda kısa süreli ve güvenilir olup rutin analizlerde diğer yöntemlere göre (HPLC gibi) düşük-maliyetli alternatif yöntemlerdir.
2. Çalışmamızın ikinci bölümünde, incelenen pekmez ve üzüm örneklerinin karbohidrat verileri (fruktoz, glikoz ve sakaroz değerleri) Şekil 8.26'da yer alan üçgen diyagramında yerleştirilmiş ve Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi tebliğinde [45] belirtilen aralıklar baz alınarak elde edilen işaretlenmiş bölge içinde olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Eğer pekmez analizi ile bulunan sonuçlar bu bölge içinde değil ise o pekmezin hileli olma olasılığının oldukça yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

3. Yine ikinci bölümünde yer alan çalışma, ülkemiz topraklarında yetiştirilen üzüm ve üzüm ürünleri ile ilgili olarak örneklerin fermente edilmesiyle elde edilen alkolde SNIF-NMR® ve IR-MS yöntemlerinin kullanılmasıyla yapılan ilk izotopik çalışmadır.
4. İlk olarak yapılan bu çalışmada SNIF-NMR® ve IRMS verilerinin birlikte kullanılmasıyla Şekil 8.32’de gösterilen **Tağşiş üçgeni** adı verilen grafik elde edilmiş ve bu grafik sayesinde üzüm ve pekmez örneklerinin orijinal veya hileli olup olmadığı hatta hileli ise ne tür bir katkı ile hile yapıldığı hakkında bilgi edinilebilmektedir.
5. Yapılan çalışmalarda saf pekmez örneklerinin hem SNIF-NMR® hem de IRMS sonuçları kirletilen örneklerinkinden belirgin derece farklı oldukları gözlemlenmiştir.
6. Ülkemizde bolca üretilen üzüm ve bu üzümünden elde edilen ürünlerin kontrolü önem arz etmekle beraber, ülkemiz topraklarında yetişen üzümle ilgili bölgesel farklandırmaya yönelik herhangi bir izotopik analiz şu ana kadar yapılmamıştır. Aynı bölgede yetişen pekmez ve üzüm numunelerinin SNIF-NMR sonucu elde edilen (D/H)_I ve (D/H)_{II} sonuçlarının büyük oranda örtüştüğü ve aynı zamanda bu değerlerin meteorolojik verilerle oluşturulan bölgelerle de uyumlu olduğu görülmüştür. İlk olarak tarafımızca yapılan bu çalışmada pekmez ve üzüm örnekleri bölgesel olarak farklandırılmışlardır.
7. Ayrıca pekmez örneklerinin, aynı bölgede yetiştirilen kuru üzüm örneklerine göre döteryumca daha zengin oldukları tespit edilmiştir.
8. Bir pekmezin hileli olup olmadığını anlamak için aşağıda belirtilen yol izlenir:
 - a. Numunelerin C13 analizleri, toplu kararlı izotop analizinde bütün olarak geleneksel elementel analizörle CO₂’ye dönüştürülerek yapılır. Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi tebliğinde sıvı pekmezin $\delta^{13}C(^{13}C/^{12}C)$ değerinin -23,5’den daha negatif olması gerektiği belirtilmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda tağşişli gıda üreticilerinin gıdalara sentetik tatlandırıcı ilavesiyle bu tekniği bertaraf edecek biçimde kodeks ve yönetmeliklerde belirtilen $\delta^{13}C$ değerinde hileli ürünler ürettikleri görülmüştür [50].

Öncelikle çalışmamızın ilk kısmında yer alan analizlerle, yukarıda belirtilen türdeki sahteciliğin tespiti amacıyla en yaygın sentetik tatlandırıcılardan aspartam ve sakarin aranır.

- b. Bunlar bulunamadığında fruktoz, glikoz ve sakkaroz gibi doğal kaynaklı şeker analizi sıvı kromatografisi ile yapılarak bu değerlerin Şekil 8.26'da görülen üçgen diyagramında işaretlenmiş bölge içinde olup olmadığı kontrol edilir.
- c. Ancak pekmeze eşit miktarlarda fruktoz ve glikoz ilavesi veya invert şeker ilavesi yapılarak fruktoz/glikoz oranı doğal şıradaki gibi 0,9-1,1 arasında ayarlandı ise, bu ilaveyi kromatografik olarak tespit etmek mümkün değildir. Bu aşamada kararlı izotop analizleri önem kazanır. SNIF-NMR® ve IRMS analizleri sonucu elde edilen veriler, Şekil 8.32'de gösterilen Tağış üçgeninde referans bölge içersinde yer alıp almadığı kontrol edilir ve farklı bir bölgede yer alması halinde ise ne tür bir katkı ile hile yapıldığı hakkında yorum yapılabilir.

KAYNAKLAR

-
- [1] TS EN 12856 (2003). Gıda Maddeleri-Asesulfam-K, Aspartam ve Sakarin tayini-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yöntem, TSE, I. Baskı, Ankara.
- [2] Sergio A., Salvador G. ve Miguel G., (2004). FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners, J. Agric. Food Chem., Vol. 52, No. 26.
- [3] Aboul-Enein H. Y. ve Bakr S. A., (2004). Comparative Study of The Separation and Determination of Aspartame and Its Decomposition Products in Bulk Material and Diet Soft Drinks By HPLC and CE, J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 20(9), 1437-1444.
- [4] Santini A. O. , Lemos S. C. , Pezza H. R. , Carloni-Filho J. ve Pezza L.,(2008). Development of a potentiometric sensor for the determination of saccharin in instant tea powders, diet soft drinks and strawberry dietetic jam, Microchemical Journal, Volume 90, Issue 2, 124-128.
- [5] Coppini D. ve Albasini A., Mitt. Geb. (1968). Lebensmittelunters. Hyg. 59,239.
- [6] Conacher H.B.S. ve O'Brien R.C., (1970). J. AOAC Int. 53, 1117.
- [7] Zhu Y., Guo Y. ve Ye M., (2005). Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography, J. Chromatogr. A, 1085, 143–146.
- [8] Idris M., Srivastava S., Baggi T.R. ve Shukla S. K., (2010). High-Performance Thin-Layer Chromatography Analysis of Saccharin in Foods and Beverages, Journal of Planar Chromatography 23 5, 339–342.
- [9] Sherma J., Chapin S. ve Follenweiler J., (1985). Quantitative TLC determination of aspartame in beverages, Americ. Lab. 17, (3) 131-133.
- [10] Cakar M. ve Gordana P., (2006). Determination of Saccharin in Pharmaceuticals by High Performance Thin Layer Chromatography, J. Serb. Chem. Soc., 71 (6) 669–676
- [11] Türkiye İstatistik Kurumu, http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13, 20 Temmuz 2011.
- [12] Akaydın(İyibil), C., (2009). Ticari Olarak Üretilen Bazı Sıvı Ve Katı Üzüm Pekmezlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

- [13] Şimşek A., Artık N. ve Başpınar E., (2004). Detection of raisin concentrate (Pekmez) adulteration by regression analysis method , Journal of Food Composition and Analysis, 17,155–163
- [14] Şimşek A., (2000). Farklı Hammaddelerden Üretilen Pekmezlerin Bileşimi Üzerine Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniverditesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [15] Gümüştas B., (2010). Identification Studies For Honey, Grape Syrup And Fruit Juice Produced In Turkey By Using HPLC and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Ratio Mass Spectrometric Methods, Master Thesis, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [16] Odacı, D., (2010). Karbohidrat Analizine Yönelik Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi, Karakterizasyon Ve Uygulamaları, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [17] Wikipedia, Karbohidrat, <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbohydrate>, 23 Mart 2011.
- [18] Yılmaz, N., (2007). Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [19] Küçükkömürler, S., (1996). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Yapay Tatlandırıcılar Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [20] Özbek, C., (2010). Hakkâri Yöresinde Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinin Bazı Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- [21] Karaca İ., (2009). Pekmez Örneklerinde Vitamin ve Mineral Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- [22] Skoog-Holler–Nieman. (1998). Principles of Instrumental Analysis, 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, Amerika Birleşik Devletleri.
- [23] Gümüştas, M., (2009). Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü ve Kalsiyum Kanal Blokörü Kombinasyonu İlaçların Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile Aynı Anda Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [24] Sewel, P. A., Clarke, B. ve Kealey, D. (1987). Chromatographic Seperations, John Wiley and Sons Inc., İngiltere.
- [25] Çelebi, B., (2010). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin İmmobilize Enzim Reaktörlerinin Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [26] Guiochon, G., (2007). Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 1168 , 101–168.
- [27] Sherma J., (2000), Review-Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis, J. Chromatogr. A , 880 129– 147.
- [28] Sherma J., (2003). Handbook of Thin-Layer Cromatography, Marcel Dekker Inc., Amerika Birleşik Devletleri.

- [29] Helmut J., Werner F., Walter F. ve Hans W., (1990). Thin-layer Chromatography Reagents and Dedection Methods, Volume 1a, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Almanya.
- [30] Aydemir, M., (2005). Değişik Yörelere Toplanan *Tanacetum parthenium* L. Türünde Parthenolide' in Kısmi En Küçük Kareler Spektroskopik Kalibrasyon(PLS) Yöntemiyle Miktar Tayini Ve İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [31] Morlock G.E. ve Wolfgang S., (2007). Review-The Contribution of Planar Chromatography to Food Analysis, Journal of Planar Chromatography 20, 6, 399-406.
- [32] Wall P. E., (2005). Thin-layer Chromatography A Modern Practical Approach, The Royal Society of Chemistry, İngiltere.
- [33] Sun Da-Wen, (2008). Modern Techniques for Food Authentication, First Edition, Elsevier Inc. Kanada.
- [34] Calderone G. ve Guillou C., (2008). Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages, Food Chemistry 106, 1399–1405.
- [35] Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Açık Yüzey Buharlaşma Rasatlarının Değerlendirmesi, <http://www.dmi.gov.tr/veridegerlendirme/acik-yuzey-buharlasma.aspx>, 23 Mart 2011.
- [36] Gerard J. M., Serge A. ve Maryvonne L. M., (2006). SNIF-NMR—Part 1: Principles, Modern Magnetic Resonance, Part 7, 1651-1658.
- [37] Wikipedia, Karbon Döngüsü, http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_fixation, 23 Mart 2011.
- [38] Tarım ve Hayvancılığın Adresi, <http://www.tarimsal.net/?p=575>, 23 Mart 2011.
- [39] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <http://www.ich.org/products-guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, 23 Mart 2011.
- [40] AOAC 980.13 (1998). Fructose, Glucose, Lactose, Maltose, and Sucrose in Milk Chocolate Liquid Chromatographic Method, AOAC INTERNATIONAL, 16th Ed., Gaithersburg.
- [41] OIV-MA-AS311-05 (2011). Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR/RMN-FINS), OIV, Paris.
- [42] AOAC 932.14C (1998). Solids in Syrup By Means of Refractometer, AOAC INTERNATIONAL, 16th Ed., Gaithersburg.
- [43] Jamin E., Martin F. ve Martin G.G. (2004). “Determination of the ¹³C/¹²C Ratio of Ethanol Derived from Fruit Juice and Maple Syrup by Isotope Ratio Mass Spectrometry: Collaborative Study”, Journal of AOAC INTERNATIONAL, Vol.87, No:3.
- [44] Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>, 23 Mart 2011.

- [45] Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Üzüm Pekmezi Tebliği 2007/27, (26553), 15.06.2007.
- [46] Jamin E. ve Martin G.J., (2008). SNIF-NMR—Part 4: Applications in an Economic Context: The Example of Wines, Spirits, and Juices, Graham A. Webb (ed.), Modern Magnetic Resonance, 1681–1687.
- [47] Guyon F., Douet C., Colas S., Salagoity M. ve Medina B., (2006). Effects of Must Concentration Techniques on Wine Isotopic Parameters, J. Agric. Food Chem., 54, 9918-9923.
- [48] Meteoroloji Genel Müdürlüğü, <http://www.dmi.gov.tr>, 23 Mart 2011.
- [49] Zile ve Zilelilerin Sitesi, <http://www.zilesitesi.com/sayfa.asp?id=2>, 26 Haziran 2011.
- [50] Cabanero A. I., Recio J. L. ve Rupeárez M., (2006). Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection, J. Agric. Food Chem., 54, 9719-9727.



BAG
ORTA ÖLÇÜLÜ BÜYÜME SEZONUN BAŞLANGIÇ TARİHLERİ (ORTA ÖLÇÜLÜ)

TARİH (GÜN)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
TARİH (GÜN)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Muharrem YILMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.05.1978/Kilis
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : muharremy@gmail.com, muharremy@gumruk.gov.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Organik Kimya	Hacettepe Üniversitesi	2005
Lisans	Kimya (İng.)	Hacettepe Üniversitesi	2002
Lise	Fen Bilimleri	Cumhuriyet Lisesi	1996

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2006	Gümrük Müsteşarlığı İstanbul Gümrük ve Muhafaza Başmüdürlüğü	Kimyager
2002	Hacettepe Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

PROJELERİ

1. Gümrük Laboratuarlarının Modernizasyonu Cihaz Alımı Projesi

ÖDÜLLERİ

1. Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Birinciliği (2002)