

**BAZI AMİNO ASİT VE PEPTİTLERLE MAİLLARD TEPKİMESİNİN  
KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Kudret AKPINAR**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**2008**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI AMİNO ASİT VE PEPTİTLERLE MAİLLARD TEPKİMESİNİN**  
**KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Kudret AKPINAR**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez ....../...../2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Güler AYRANCI (Danışman) .....

Prof. Dr. Mustafa CENGİZ .....

Prof. Dr. Muharrem CERTEL .....

Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR .....

Prof. Dr. Erol AYRANCI .....

## ÖZET

### BAZI AMİNO ASİT VE PEPTİTLERLE MAİLLARD TEPKİMESİNİN KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

**Kudret AKPINAR**

**Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı**  
**Danışman: Prof. Dr. Güler AYRANCI**  
**Şubat 2008, 90 sayfa**

Bu çalışmada model sistemler kullanarak glukoz ile bir amino asit veya bu amino asidin dimeri, trimeri veya tetrameri arasındaki Maillard tepkimesinin kinetiği, kararma oluşumunun ve 5-hidroksimetilfurfural miktarlarının FTIR, UV-Vis ve HPLC teknikleri ile takip edilmesiyle incelenmiştir.

Maillard tepkimesinin kinetiğinin takibinde en güvenilir tekniğin HPLC olduğu anlaşılmıştır. Çalışılan deneysel koşullarda kararma ve 5-hidroksimetilfurfural oluşumunun sıfır derece kinetikle meydana geldiği gözlenmiş ve tüm model sistemlerle ilgili hız sabitleri ve aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır. Kararma oluşumu için aktivasyon enerjileri glisin/glukoz, glygly/glukoz, glyglygly/glukoz ve glyglyglygly/glukoz model sistemleri için sırasıyla 93,4, 72,9, 99,8 ve 125,6 kJ/mol ve HMF üretimi için aktivasyon enerjileri aynı model sistemler için sırasıyla 187,7, 146,8, 180,7 ve 245,1 kJ/mol olarak bulunmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Maillard tepkimesinin kinetiği, kararma tepkimeleri, 5-hidroksimetilfurfural, glukoz, amino asitler

**JÜRİ:** Prof. Dr. Güler AYRANCI  
Prof. Dr. Mustafa CENGİZ  
Prof. Dr. Muharrem CERTEL  
Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR  
Prof. Dr. Erol AYRANCI

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE KINETICS OF MAILLARD REACTION WITH SOME AMINO ACIDS AND PEPTIDES**

**Kudret AKPINAR**

**PhD in Chemistry**

**Advisor: Prof. Dr. Güler AYRANCI**

**February 2008, 90 Pages**

In this work, the kinetics of the Maillard reaction between glucose and an amino acid or its dimer, trimer and tetramer have been investigated by examining the occurrence of browning and the amounts of 5-hydroxymethylfurfural in model systems by using FTIR, UV-Vis and HPLC techniques.

It has been realised that the most reliable technique for the examination of the kinetics of the Maillard reaction is the HPLC technique. The occurrence of browning and 5-hydroxymethylfurfural production have been observed to follow zero-order kinetics and the rate constants and the activation energies related to each model system were calculated. The activation energies of browning for glycine/glucose, glygly/glucose, glyglygly/glucose and glyglyglygly/glucose model systems were found to be 93.4, 72.9, 99.8 and 125.6 kJ/mol, respectively. The activation energies of 5-hydroxymethylfurfural formation for the same model systems were found as 187.7, 146.8, 180.7 and 245.1 kJ/mol, respectively.

**KEYWORDS:** Kinetics of Maillard reaction, browning reactions, 5-hydroxymethylfurfural, glucose, amino acids

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Güler AYRANCI  
Prof. Dr. Mustafa CENGİZ  
Prof. Dr. Muharrem CERTEL  
Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR  
Prof. Dr. Erol AYRANCI

## ÖNSÖZ

İnsanların eskiden beri birçok besin maddesini doğal haliyle değil de pişirerek yemeyi tercih etmesinde mikropları öldürmek gibi bir amacın olamayacağı, başlıca tercih nedeninin elde edilen değişik tatlar olduğu kolaylıkla tahmin edilebilir. Maillard tepkimesinin keşfinden sonra da, gıdaların duylara hitap eden özelliklerini kontrol etmek amacıyla, bu tepkimeye araştırmacıların gösterdiği ilgi çok büyük olmuştur. Yapılan bu çalışmaların büyük bir kısmı çeşitli başlangıç maddelerinin ortaya koyduğu tepkime seyrinin izlenmesidir.

Bu çalışmada ilk defa bir amino asit, kendi birimlerinden oluşan iki, üç ve dört birimli peptitleriyle birlikte ele alınmıştır. Bu sayede, peptit birimleriyle basitçe ve sistematik olarak büyüyen bir bileşik yapısının Maillard tepkimesinde ortaya çıkarabileceği kinetik sonuçlar incelenmiştir.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve destekleyen, danışman hocam Prof. Dr. Güler AYRANCI' ya, önerilerinden ve birçok konuda verdikleri destekten dolayı Prof. Dr. Erol AYRANCI' ya ve Prof. Dr. Muharrem CERTTEL' e, çalışmanın istatistik analizinde yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet Ziya FIRAT' a, bölümümüzün diğer öğretim elemanlarına, çeşitli yardımlarından dolayı başta Dr. Özgür Altan BOZDEMİR olmak üzere bölümümüzdeki tüm asistan arkadaşlara, çalışmanın son dönemlerinde stajı nedeniyle birlikte çalıştığımız bölümümüz son sınıf öğrencisi Hamdi AKÇA' ya, projeye mali destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne, maddi ve manevi her zaman beni destekleyen sevgili anne ve babama, moral kaynağım sevgili eşime ve çalışmamın son yılı içinde doğumuyla bana mutluluk getiren sevgili kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kudret AKPINAR

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Maillard Tepkimesi .....	1
1.2. Maillard Tepkimesini Kontrol Eden Faktörler .....	4
1.3. Maillard Tepkimesinin Gıda Ürünlerine Etkisi .....	10
1.4. Melanoidinler .....	11
1.5. 5-hidroksimetilfufural (HMF) .....	12
1.6. Maillard Tepkimesinin Kinetiği .....	14
1.7. Faktöriyel Deneme Deseni .....	20
1.8. Araştırmanın Amacı .....	21
2. MATERYAL VE METOD .....	22
2.1. Materyal .....	22
2.1.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler .....	22
2.1.2. Deneyleerde kullanılan cihazlar ve ekipmanları .....	22
2.2. Metot .....	23
2.2.1. Tepkimenin FTIR spektrometresi ile çalışılması .....	23
2.2.2. Tepkimenin UV-Vis spektrofotometresi ile çalışılması .....	26
2.2.3. Tepkimenin HPLC ile çalışılması .....	27
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	28
3.1. FTIR Spektrometresi ile Yapılan Çalışmalar .....	28
3.2. UV-Vis Spektrofotometresi ile Yapılan Çalışmalar .....	34
3.3. HPLC ile Yapılan Çalışmalar .....	44
4. SONUÇ .....	74
5. KAYNAKLAR .....	76

6. EKLER.....	83
EK-1. UV-Vis verileri .....	83
EK-2. Örnek HPLC kromatogramları .....	85
EK-3. HPLC kromatogramlarına ait veriler.....	87
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

µm	mikrometre
nm	nanometre
mm	milimetre
ml	mililitre
ppm	milyonda bir kısım
kJ	kilojul
kcal	kilokalori
°C	santigrat derece
K	Kelvin
M	Molarite
r	Regresyon analizinde korelasyon katsayısı
R <sup>2</sup>	Regresyon analizinde korelasyon katsayısının karesi

### Kısaltmalar

HMF	5-hidroksimetilfurfural
FTIR	Fourier Transform Infrared
UV-Vis	Ultraviyoleet - Visible
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Glygly	Glisil glisin
Glyglygly	Glisil glisil glisin
Glyglyglygly	Glisil glisil glisil glisin
Lys	Lisin
Lyslys	Lisil lisin
Lyslyslys	Lisil lisil lisin
ANOVA	Analysis of Vairance
SAS	Statistical Analysis Software
DAD	Diode Array Detector



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hodge'nin Maillard tepkimesi şeması .....	2
Şekil 1.2. Maillard tepkimesinin ilk basamakları .....	5
Şekil 1.3. Glisin/glukoz tepkimesinde fosfat anyonunun etkisi için önerilen mekanizma.....	7
Şekil 1.4. HMF için genel olarak kabul edilen oluşum basamakları .....	13
Şekil 2.1. FTIR' da kullanılan sızdırmaz ısıtılabilir sıvı hücre ve ısı ceketini.....	23
Şekil 2.2. FTIR' da kullanılan ısıtma sistemi.....	23
Şekil 2.3. Dört farklı termistör tipi .....	25
Şekil 2.4. Termistörün sıcaklık-direnç değişimi grafiği .....	25
Şekil 3.1. Saf glukozun nujolda (a) ve KBr' deki (b) spektrumu .....	28
Şekil 3.2. Saf alaninin FTIR spektrumu .....	29
Şekil 3.3. Saf suyun IR spektrumu .....	30
Şekil 3.4. Referans olarak suyun kaydedildiği bir su spektrumu .....	30
Şekil 3.5. Saf glukozun ve alaninin spektrumu (a). Alanin/glukozun pH 7 ve 33 °C' de 10 saatlik ısıtma süresinde kaydedilmiş olan spektrumları (b).....	31
Şekil 3.6. Alanin ve glukozun pH 9' da 65-68 °C' de 35-40 dakikada bir kaydedilmiş olan spektrumları .....	32
Şekil 3.7. Seçilen çeşitli piklerdeki absorpsiyon değişimi .....	32
Şekil 3.8. Gliserol ortamında alanin/glukoz sistemin FTIR spektrumları .....	34
Şekil 3.9. Çeşitli derişimlerdeki saf HMF'nin UV spektrumu .....	35
Şekil 3.10. HMF için kalibrasyon eğrisi .....	36
Şekil 3.11. Lisin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları.....	37
Şekil 3.12. Lisin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları.....	37
Şekil 3.13. Lisin/glukoz (pH 6) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları.....	38
Şekil 3.14. Lisin/glukoz (pH 6) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	38

Şekil 3.15. Serin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	39
Şekil 3.16. Serin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	39
Şekil 3.17. Glisin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	40
Şekil 3.18. Glisin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	40
Şekil 3.19. Alanin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	41
Şekil 3.20. Alanin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları .....	41
Şekil 3.21. Lisin/glukoz sistemine ait pH 7' de ve 55°C' deki HMF oluşumu .....	43
Şekil 3.22. Standart HMF' ye ait kromatogram (50 ppm) .....	44
Şekil 3.23. HMF için kalibrasyon eğrisi .....	45
Şekil 3.24. Glyglygly' nin glukoz ile tepkimesinden (pH 5,5, 110°C) 4 saat sonra alınan numuneye ait spektro-kromatogram .....	46
Şekil 3.25. Standart HMF' nin (7.5 ppm) spektro-kromatogramı .....	46
Şekil 3.26. Glygly' nin glukoz ile tepkimesinden (pH 5,5, 110°C), 3 saat sonra alınan numunedeki HMF' ye ait pikin, standart HMF' nin dalga boyu aralığıyla ve sinyalin konumuyla karşılaştırıldığını gösteren grafikler.....	47
Şekil 3.27. Tepkime karışımındaki HMF' ye ait pik (1) ile aynı karışıma standart HMF eklendikten sonra elde edilen piklerin (2) karşılaştırılması(Glygly, 80°C) .....	48
Şekil 3.28. Tepkime karışımındaki HMF' ye ait pik (1) ile aynı karışıma standart HMF eklendikten sonra elde edilen piklerin (2) karşılaştırılması (Glyglygly, 80°C) .....	48
Şekil 3.29. Glisin/glukoz sisteminde 70°C' deki HMF oluşumu .....	49
Şekil 3.30. Glygly/glukoz sisteminde 70°C' deki HMF oluşumu .....	49
Şekil 3.31. Glyglygly/glukoz sisteminde 70°C' deki HMF oluşumu .....	50
Şekil 3.32. Glisin/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi.....	50

Şekil 3.33. Glygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi .....	51
Şekil 3.34. Glyglygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi .....	51
Şekil 3.35. Glyglyglygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi .....	52
Şekil 3.36. 70°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri.....	53
Şekil 3.37. 80°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri.....	53
Şekil 3.38. 90°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri .....	54
Şekil 3.39. 100°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri .....	54
Şekil 3.40. 110°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri .....	55
Şekil 3.41. Glisin anhidrit için kalibrasyon eğrisi .....	57
Şekil 3.42. 90°C’ de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı .....	58
Şekil 3.43. 100°C’ de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı .....	58
Şekil 3.44. 110°C’ de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı .....	59
Şekil 3.45. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 90°C’ deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri .....	59
Şekil 3.46. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 100°C’ deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri .....	60
Şekil 3.47. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 110°C’ deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri .....	60
Şekil 3.48. HMF oluşumu için glisin ve peptitlerine ait Arrhenius grafikleri .....	64
Şekil 3.49. Glisin/glukoz sisteminin ısıtılmasıyla oluşan kararma ürünlerinin UV-Vis spektrofotometresiyle (üstte) ve HLPC’ nin DAD ile kaydedilen spektro-kromatogramı (altta).....	65
Şekil 3.50. Glisin/glukoz sistemine ait bir spektro-kromatogram .....	66

Şekil 3.51. Glisin/glukoz sisteminde kararın miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi.....	67
Şekil 3.52. Glygly/glukoz sisteminde kararın miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi .....	67
Şekil 3.53. Glyglygly/glukoz sisteminde kararın miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi .....	68
Şekil 3.54. Glyglyglygly/glukoz sisteminde kararın miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi .....	68
Şekil 6.1. 80°C’ de glisin/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram .....	85
Şekil 6.2. 90°C’ de glygly/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram .....	85
Şekil 6.3. 100°C’ de glisin/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram .....	86
Şekil 6.4. 110°C’ de glyglygly/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram .....	86

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Amino asitler .....	9
Çizelge 3.1. UV-Vis verilerinin derişim-zaman eğrilerinden hesaplanan HMF oluşum hız sabitleri .....	43
Çizelge 3.2. Farklı sıcaklıklardaki model sistemlerin ürettikleri HMF için hesaplanan hız sabitleri.....	62
Çizelge 3.3. Model sistemlerde HMF oluşumuna ait aktivasyon enerjisi ve frekans faktörü değerleri.....	64
Çizelge 3.4. Kararma miktarları için hesaplanan hız sabitleri .....	70
Çizelge 3.5. Model sistemlerde kararmaya ait aktivasyon enerjisi ve frekans faktörü değerleri .....	70
Çizelge 3.6. HMF oluşumu için varyans analizi tablosu .....	71
Çizelge 3.7. Kararma oluşumu için varyans analizi tablosu .....	72
Çizelge 3.8. Çoklu karşılaştırma testleri .....	73
Çizelge 6.1. UV-Vis ile çalışılan model sistemlerin derişim-zaman değerleri .....	83
Çizelge 6.2. Glisin/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri.....	87
Çizelge 6.3. Glygly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri.....	88
Çizelge 6.4. Glyglygly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri .....	89
Çizelge 6.5. Glyglyglygly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri .....	90

# 1. GİRİŞ

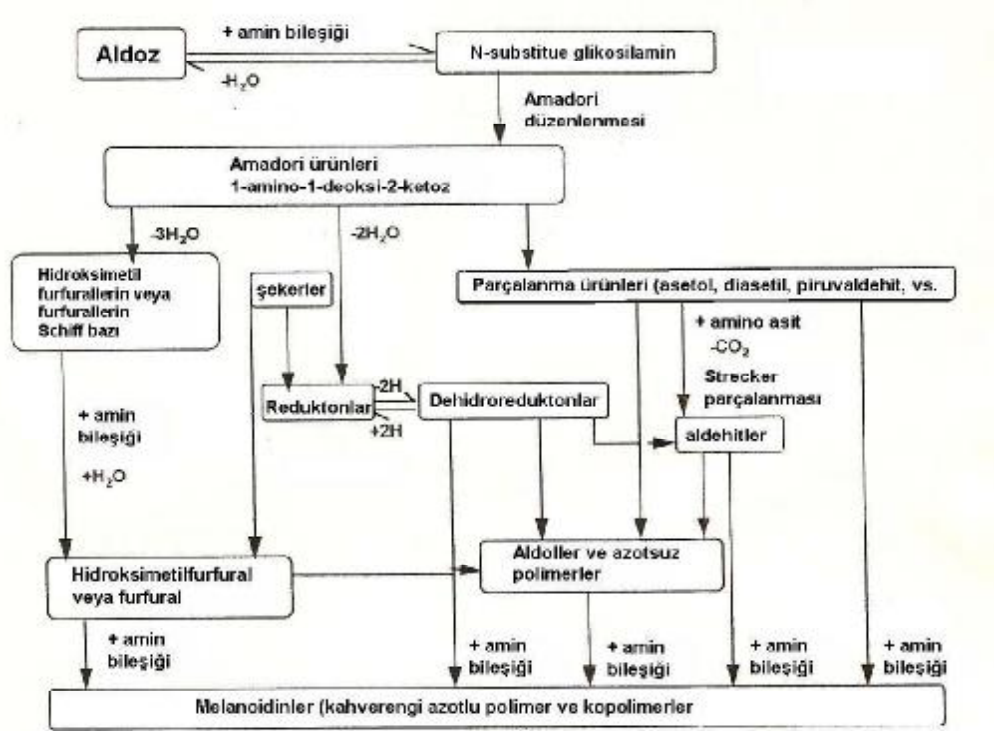
## 1.1. Maillard Tepkimesi

Maillard tepkimesi, gıdalarda enzimsiz kararına tepkimesi olarak, organizma içinde ise glikolizasyon olarak adlandırılan, ilk adımı karbonil ve amin bileşikleri arasında gerçekleşen bir dizi ardışık ve paralel basamaklarla melanoidin denilen kahverengi pigmentlerin oluşumuna kadar devam eden bir ağ tepkimesidir. Tüm ardışık ve paralel basamaklar aynı anda gerçekleşmekte, hepsi birbirine etki etmekte ve birbirleri için farklı ortamlar oluşturmaktadırlar (Silván vd 2006). Bu tepkime ilk olarak Fransız kimyager Lois Camille Maillard tarafından 1912–1917 yılları arasında glisin ve glukoz arasındaki tepkimenin incelenmesiyle keşfedilmiştir. Maillard tepkimesi, gıdalarda karbonil bileşiği olarak indirgen şekerlerin ve amin bileşiği olarak da aminoasitler, peptitler ve proteinlerin oluşturduğu madde grupları arasında gerçekleşerek gıda ürününün görünümünü, aromasını ve kalitesini değiştirebilir. Organizmada ise, Maillard tepkimesi, proteinlerde çoğunlukla yan zincirde yer alan ε-amin grubu veya protein peptit zincirinin N ucundaki amin grubu (terminal amin grubu) ile yine indirgen şekerler arasında gerçekleşmekte ve tepkimenin ürünlerinin yüksek miktarlara ulaşması ile çok sayıda olumsuz sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bunlar arasında göz merceğinde katarakt oluşturma (Nagaraj ve Sady 1996), yaşlılığa bağlı doku değişiklikleri, kaslarda kütle kaybı, böbrek yetmezliği, damar sertliği, damarlarda yapı bozulmaları, koroner yetmezlik, ciltte leke oluşumu, kemik erimesi ve sinir iletiminde zayıflama gibi sorunlar sayılabilir (Yeboah ve Yaylayan 2001, Bailey vd 1998, Sullivan 1996).

Gıdaları ve organizmayı bu denli etkileyen söz konusu tepkime ağının doğrudan gıdalar üzerinde ve canlı sistemlerde çalışılması son derece karmaşık olduğundan, araştırmaların çoğunlukla model sistemler kullanarak yapılması tercih edilmektedir. Bu tercihte sadece tepkimenin karmaşık olmasının değil, oluşan ara ürünlerin tepkime ortamından ayrılmasında ve saflaştırılmasında karşılaşılan zorlukların da payı vardır. Tepkime ağının bazı basamaklarındaki ara ürünlerin oluşumuna ilişkin, literatürde yer

alan saptanmış veya önerilmiş birçok mekanizma, model sistemlerle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Ledl ve Schleicher 1990).

Maillard tepkimesinin 1953 yılında John Hodge tarafından verilen şeması Şekil 1.1’ de görülmektedir.



Şekil 1.1. Hodge'nin Maillard tepkimesi şeması

Hodge' nin şemasına göre başlangıçta glukoz gibi bir indirgen şeker, serbest bir amino grubu taşıyan bir bileşikle kondenzasyona girip bir kondenzasyon ürünü olan N-substitue glikosilamini verir. Bu bileşik Amadori düzenlenme tepkimesiyle Amadori düzenlenme ürününü verir. Amadori düzenlenme ürününün takip eden parçalanması sistemin pH' sına bağlıdır. pH 7 ve altında bu ürün 1,2-enolizasyonla, pentozların varlığında furfural veya heksozların varlığında HMF' yi (5-hidroksimetilfurfural) oluşturur. pH 7' nin üstünde, Amadori ürününün parçalanması esas olarak 2,3-enolizasyon sonucunda çeşitli indirgenler ve asetol, pirüvaldehit ve diasetil gibi

bölünme ürünlerini meydana getirir. Tüm bu bileşikler çok aktiftirler ve daha ileri tepkimelerde yer alırlar. Karbonil bileşikleri serbest amino gruplarıyla yoğunlaşabilirler ve böylece tepkime ürünlerine azotun girmesini sağlarlar. Dikarbonil bileşikleri amino asitlerle tepkimeye girip aldehytlere ve  $\alpha$ -amino ketonları oluştururlar. Bu tepkime, Strecker parçalanması olarak bilinir. Bunun devamında halkalanmalar, dehidrasyonlar, retroaldolizasyonlar, düzenlenmeler, izomerizasyonlar ve daha ileri kondenzasyonlar gibi çeşitli tepkimeler yer alır ve tüm bu tepkimelerin sonunda melanoidinler olarak bilinen azot taşıyan kahverengi polimerler ve kopolimerler meydana gelir (Martins vd 2001).

Maillard tepkimesi ürünlerinin karmaşıklığı ve çeşitliliği uzun yıllardan beri araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Hodge' nin belirtmediği yeni ve önemli tepkime basamakları önerilmiştir. Örneğin Martins vd (2001), McWeeny vd' nin glukozun girdiği Maillard tepkimesinde en önemli ara ürünlerin 3-deoksiheksosuloz ve heksosuloz-3-en olduğunu gözlemlediğini bildirmiştir. Martins vd (2001), anahtar araürünlerin 1-, 3- ve 4-deoksiheksosulos olduğu farklı tepkime basamaklarının da Tressl vd tarafından önerildiğini belirtmiştir. Ayrıca, pH' nın temel bir etkisi de açıklanmıştır. Enolizasyon tepkimeleriyle birlikte, Amadori ürünü ve onun dikarbonil türevleri, gliseraldehit ve diketonlar gibi aktif ve C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> ve C<sub>5</sub> şeker parçalanma ürünleri verecek retroaldol tepkimelerine girebilir. Retroaldol tepkimeleri yüksek pH da daha önemli hale gelebilirler. Bazı koşullarda Amadori düzenlenme ürünlerinin, serbest amino asitlere ilave olarak asetik asit ve piruvaldehit ve diğer küçük şekerleri oluşturabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak yüksek pH' nın koku oluşumu için gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan,  $\alpha$ -hidroksi karbonillerin,  $\alpha$ -dikarbonillerin ve formik asidin dahil olduğu redoks mekanizmaları Yaylayan ve Huyghues-Despointes (1996) tarafından tespit edilmiştir. Martins vd (2001), Maillard tepkimesinin bazı araştırmacılar tarafından "kimyasal havuz" şeklinde tanımlandığından bahsetmektedir. Bu tanım, Maillard tepkimesi sırasında amino asitlerin ve şekerlerin Amadori ürününü vermek için girdikleri degradasyon yanında kendi bağımsız degradasyonlarını da gerçekleştirmelerinin gözlenmesine dayanmaktadır. Yapılan tüm araştırmalara rağmen, Maillard tepkimesinin hala tam olarak açıklanmamış olduğu da bilinen bir gerçektir (Martins vd 2001).



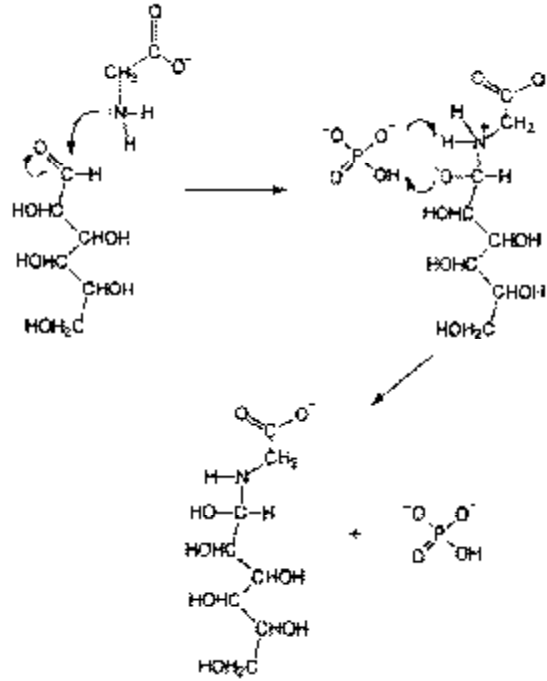
## 1.2. Maillard Tepkimesini Kontrol Eden Faktörler

Maillard tepkimesinin sıcaklık, pH, ısıtma süresi, su aktivitesi, reaktiflerin türü ve derişim oranı, elektrolitlerin ve herhangi bir inhibitörün varlığı gibi faktörlerden etkilendiğı bilinmektedir. Sıcaklık etkisi bu tepkime için kritik bir öneme sahiptir. Genel olarak sıcaklığın her 10°C arttırılışında tepkime hızı en azından iki kat artar. Eğer Maillard tepkimesinin gelişmesini ölçmek için kararma kullanılırsa 20°C’ de dört hafta, 100°C’ de üç saat ve 150°C’ de 5 dakika sonunda yaklaşık olarak aynı sonuç gözlenir (Ledl ve Schleicher 1990). Asitlik düzeyinin etkisi ise tepkimenin çeşitli basamaklarında farklı olabilmektedir. Örneğın başlangıç basamaklarında Schiff bazı oluşumu ve sonra onu takip eden Amadori düzenlenmeleri asit katalizli tepkime adımlarıdır (Şekil 1.2). Bu basamaklardan sonra pH 7’ den düşük ise 5-hidroksimetilfurfural (HMF) oluşumunu içeren tepkime yolu takip edilir. Fakat HMF oluşumundan sonra renk oluşumunu sağlayan indirgenlerin meydana gelişi pH’ nın yükselmesine bağılı olarak daha da artar (Ames 1998). Diğer yandan ilk basamaklar asit katalizli olmasına rağmen, tepkimedeki melanoidin oluşumu takip edilirse, pH arttıkça tepkime hızının da arttığı gözlenir. Ajandouz ve Puigserver 1999 yılında 100°C’ de glukoz ve lizin arasındaki Maillard tepkimesine pH’ nın etkisini incelemişlerdir. İki saatlik ısıtma süresinde pH 6, 8, 10 ve 12’ deki kararma 420 nm’ de absorbans olarak ölçülmüş ve pH arttıkça kararmanın da arttığı açıkça gözlenmiştir.



sonucu vermesi, Maillard tepkimesinin dışında, ortam koşullarına bağlı olarak, şekerlerin izomerizasyon ve degradasyon gibi başka tepkimelere de girdiğini göstermektedir. Bunların yanında Maillard tepkimesine paralel olarak bir kısmının karamelleşme tepkimesine girdiği belirlenmiştir (Ajandouz ve Puigserver 1999). Glukozun harcanma hızının aminlerden daha yüksek olmasında, Amadori ürünlerinin parçalanmasıyla serbest kalan aminlerin başlangıç amin derişimini yeniden arttırmasının önemli katkısı vardır. Bu nedenle amin bileşiklerinin zamanla değişimini gösteren çalışmalarda, başlangıçtan kısa bir süre sonra amin derişiminin sabit kaldığı gözlenmiştir (van Boekel 2001). Harcanan aminlerin yerine, ilerleyen tepkime basamaklarında yeniden açığa çıkan aminler geçtiğinden harcanma ve yeniden üretilme hızı bir süre sonra hemen hemen eşit hale gelir ve amin bileşikleri artık harcanmıyormuş gibi görünür. Amin derişimindeki zaman eksenine paralel gitmeye başlayan bu kısma “kayıpsız süre” denilmektedir.

Maillard tepkimesi model sistemler yardımıyla çalışılırken, pH' yı sabitlemek için mutlaka tampon çözeltiler kullanılır. Tepkime hızının, kullanılan tampon türünden de etkilendiği bazı araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Bell 1997, Akagawa vd 2002). Maillard tepkimesi model sistemlerinde genellikle fosfat, karbonat ve sitrat tamponları kullanılmaktadır. Fosfat ve karbonat tamponlarının tepkimenin ilk basamaklarını hızlandırdığı, sitrat tamponunun ise hız arttırıcı etkisinin çok az olduğu tespit edilmiştir (Bell 1997). Özellikle fosfat tamponunun, karbonil amino tepkime adımında, aminin karbonil grubuna saldırmasıyla oluşan ara ürünün, glikosilamine çabucak dönüşmesini sağlayabildiği belirtilmektedir. Fosfat anyonu bu katalitik etkiyi, proton alma ve proton verme ikili görevini gerçekleştirerek göstermektedir (Şekil 1.3). Bell 1997' de yaptığı



Şekil 1.3. Glisin/glukoz tepkimesinde fosfat anyonunun etkisi için önerilen mekanizma.

çalışmada sıcaklığı 25°C' de pH' ı 7 de sabit tutarak glukoz ve glisin arasındaki Maillard tepkimesine fosfat tamponu derişiminin etkisini incelemiş ve 420 nm' de ölçülen kararmanın hızını 0.05M fosfat tamponunun hemen hemen hiç etkilemediğini, fakat 0,2M' lık tampon derişiminin belirli şekilde, 0,5M' lık tampon derişiminin ise önemli şekilde arttırdığını göstermiştir. Buradan hareketle, Maillard tepkimesine çok duyarlı bileşenler içeren gıda ürünlerinde besinsel değerin azalması, renk ve lezzet kaybı ihtimalinin önüne geçilmesi için hazırlanan formülasyonlarda fosfat tamponu yerine sitrat tamponunun tercih edilmesi önerilmektedir (Bell 1997).

Tepkimeye giren bileşiklerin türü ve oranları da oldukça etkili faktörlerdir. Kararma miktarına göre değerlendirme yapıldığı zaman, en aktif aminoasitlerin lizin, glisin, triptofan ve tirozin, orta düzeyde aktivite gösteren aminoasitlerin prolin, lösin, izolösin, alanin, hidroksiprolin, fenilalanin, metiyonin ve valin, düşük aktiviteye sahip

olanların ise histidin, treonin, aspartik asit, arginin, glutamik asit ve sistein olduğu tespit edilmiştir (Ashoor ve Zent 1984). Kararmadaki artış miktarına göre bir grup aminoasit ile yapılan başka bir çalışmada da aynı sonuç elde edilmiştir, fakat aminoasitlerin derişimlerdeki azalmaya göre sıralama yapıldığında sonucun yalnızca metiyoninde farklılık gösterdiği ve metiyoninin en düşük aktivite gösteren grupta yer aldığı bildirilmiştir ( Ajandouz ve Puigserver, 1999 ).

Bilindiği üzere aminoasitler kimyasal yapıları bakımından yan gruplarının (R) özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Amino asitlerin yapıları Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Maillard tepkimesinde gösterdikleri reaktivite bakımından yer aldıkları gruplara bakıldığında aminoasitlerin yan gruplarının türü ile reaktiviteleri arasında doğrudan bir ilişki kurmanın mümkün olmadığı görülmektedir. Bazık yan gruba sahip olanlardan lizin en aktif aminoasit iken arginin en düşük aktifliğe sahip olanların grubunda yer almaktadır. Lisinin çok aktif olmasında iki tane reaktif amin grubuna sahip olması neden olarak gösterilmektedir. Özellikle pH 10 seviyesinde izoelektrik noktası 9,47 olan lizin, tepkimenin ilk basamaklarında asit katalizli adımlar için ek proton sağladığı öngörülmektedir (Ajandouz ve Puigserver, 1999 ).

Serbest karbonil grubuna sahip olduklarından sadece indirgen şekerler Maillard tepkimesinde yer alabilirler. Örneğin sukroz indirgen olmadığından ancak hidroliz olup monosakkaritlerine ayrıldıktan sonra tepkimeye katılır. Düşük molekül ağırlıklı bileşikler, sterik engellemeler taşıyan yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere göre daha aktif olmaktadır. Buna göre, aldopentozlar genellikle aldoheksozlardan ve monosakkaritler de di- ve oligosakkaritlerden daha aktiftir. Böylece glukoz, laktozdan daha aktiftir (Mauron 1981). Aldozlar da genel olarak ketozlardan daha aktif görünmektedir, çünkü ketozların karbonil grubu, sterik olarak daha çok engellenmiş durumdadır.

Çizelge 1.1. Amino asitler

Amino asidin adı	Yapısı	Amino asidin adı	Yapısı
Glisin		Sistein	
Alanin		Lisin	
Lösin		Metiyonin	
İsolösin		Prolin	
Fenilalanin		Serin	
Arginin		Treonin	
Aspartik asit		Triptofan	
Asparagin		Tirozin	
Sistein		Valin	
Glutamik asit			
Glutamin			
Histidin			

### 1.3. Maillard Tepkimesinin Gıda Ürünlerine Etkisi

Maillard tepkimesinin ısı işlemi görmüş pişirilmiş et, kahve, patates cipsleri gibi gıda ürünlerinde 2500' den fazla farklı tür koku maddesi oluşturduğundan bahsedilir (Jousse vd 2002). Maillard tepkimesi sonucunda gıdada oluşan koku değişikliğini veren uçucu bileşikler, çoklu orijine sahiptirler. Gıda endüstrisinin bu alandaki ilgisi gıdanın farklı pişirme yöntemleri sırasında kazandığı karakteristik aromayı ve rengi kontrol etme isteğinden ileri gelmektedir. Kararma oluşumunda olduğu gibi, uçucu ve belirgin koku üretiminde yer alan maddelerin miktarları ve kaliteleri başlangıç maddelerine, ısı işlem parametrelerine, pH ya ve amino bileşiğinin indirgen şekere oranına bağlıdır. Martins vd (2001), Maillard tepkimesi sonucunda koku ve aroma üreten on iki farklı amino asidin belirlendiğini, bunlardan bazılarının ekmek, bisküvi, kek veya tost aroması verdiğinin rapor edildiğini yazmaktadır.

Genellikle 420 nm' de ölçülen kararma, gıdalarda Maillard tepkimesinin hangi ölçüde oluştuğunun bir göstergesidir. Kahverengi bileşiklerden önce flüoresans bileşiklerinin meydana geldiği tespit edilmiştir (Baisier and Labuza 1992, Martins vd 2003). Tepkimenin son basamağında renkli ara ürünler ve düşük molekül ağırlıklı şekerler, doymamış karbonil ürünleri gibi bileşikler bir amin katalizörlüğü varlığında yoğunlaşarak polimerleşip kahverenkli polimerleri oluştururlar. Bunların bazı bilinen özellikleri kahverenginde olmaları, yüksek molekül ağırlıklı olmaları, furan halkası ve azot içeren polimerler olmalarıdır. Karbonil, karboksil, amin, amid, pirol, indol, azometin, ester, anhidrit, eter, metil veya hidroksil grupları da içerebilirler. Maillard tepkimesi sonucunda tüm bu maddeler, gıdanın görünümünü, tadını, kokusunu, lezzetini değiştirebilir.

Gıdalarda Maillard tepkimesinin belirgin olumsuz sonuçlarından biri proteinlerin besin değerlerinin azalmasıdır. Bu durum gıdanın kalitesini düşürür. Protein besin değerinin azalması; sindirimdeki azalma, lizin ve triptofan gibi esansiyel amino asitlerin biyolojik inaktivasyonları veya parçalanmaları, proteolitik ve glikolitik enzimlerin inhibisyonları ve metal iyonlarıyla etkileşmeleri nedenleriyle olur (Narayan ve Andreotti 1989, Rendelman 1987, Morales 2005). Besin değerindeki azalma aynı

zamanda mutajenik bileşiklerin oluşumuyla da ilgilidir. Mutajenik bileşikler dikarbonil bileşikleri, metil glioksal, diasetil ve glioksal içerirler. Izgara veya kızartılmış et ve balıkta esas olarak heterosiklik aminlerden kaynaklanan mutajenik bileşikler görülmüştür (Martins vd 2001). Bu bileşikleri inhibe edebilecek bazı etmenlerin varlığından söz edilmişse de problem hala çözülmemiştir ancak Maillard tepkimesiyle oluşan mutajenlerin insanlarda gözlenen kanserle bir ilişkisi henüz rapor edilmemiştir (Janzowski vd 2000). Maillard tepkimesinin antioksidatif bileşikler ürettiği de bilinmektedir. Antioksidatif bileşikler ilk gözleyenler arasında Griffith and Johnson vardır. Bu araştırmacılar şekerli kurabiyelere %5 glukoz eklediklerinde kurabiyelerde belirgin bir kahverengileşme ve oksidatif ransiditeye karşı daha fazla dayanıklılık gözlemlemişlerdir. Daha sonra çeşitli amino bileşiklerinin şekerlerle girdikleri tepkimelerde ürettikleri antioksidatif bileşikler, gıdalarda yağ oksidasyonunu engellemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Wagner 2002).

Sonuç olarak, gıdalara uygulanan işlemler sırasında Maillard tepkimesinin istenen veya istenmeyen etkilerinin kontrol altında tutulup tüketicilerin beğenebileceği ve kendilerine yararlı kalitede ürün üretebilmesinin, gıda endüstrisinin ulaşmaya çalıştığı bir amaç olduğu söylenebilir.

#### **1.4. Melanoidinler**

Maillard tepkimesinin son ürünü olan melanoidinler hakkında bilgi çok azdır ve yapısı ile ilgili yalnızca bazı genellemeler yapılabilmektedir. Bunun yanında oluşumları ile ilgili bilgiler de henüz oldukça zayıftır (Cämmerer vd, 2002, Martins ve van Boekel, 2003, Brands vd, 2002). Bu da melanoidinlerin miktarlarının saptanmasını zorlaştırmaktadır. Fakat bu saptamayı yapmak da gıdaların üretimi esnasında, melanoidinlerin oluşumunu kontrol edebilmek için gereklidir (Martins ve van Boekel, 2003). Melanoidinler genellikle spektrofotometrik olarak ölçülür ve absorbans değeri olarak ifade edilir. Lambert-Beer yasasına göre ışık yolu sabit ise absorbans değeri ile derişim arasındaki ilişki doğrusaldır. Fakat tek bir melanoidin yapısı mevcut olmadığından, ölçülen absorbans değeri toplam bir değeri yansıtmaktadır. Melanoidinlerin UV-Vis bölgesinde alınan spektrumları da tek bir pik şeklinde



olmayıp, çeşitli yapı ve miktardaki kromoforların karmaşık ve toplamsal bir görüntüsüdür.

Cämmerer vd' nin (2002) bildirdiğine göre melanoidinlerin yapısı için ortaya atılmış üç öneri bulunmaktadır. İlki Heyns ve Hauber ve daha sonra Tressl vd' nin önerisidir. Bu öneriye göre melanoidinler, Maillard tepkimesinin ara ürünlerinden olan furan ve pirol birimlerinin birbirlerine birçok kondenzasyon tepkimesi ile bağlanması sonucunda meydana gelmektedirler. İkinci öneri Hofmann'ın düşük molekül ağırlıklı renkli maddeleri saptamasından ortaya çıkmıştır. Bu maddeler proteinlere lizin veya argininin  $\epsilon$ -amino grubu vasıtası ile bağlanarak büyük molekül ağırlıklı melanoidinleri oluşturmaktadır. Üçüncü öneri ise Yaylayan ve Kaminsky, Cämmerer ve Kroh, Kato ve Tsuchida' nın ortak önerisidir. Bu öneriye göre de, melanoidin iskeleti, Maillard tepkimesinin ilk basamaklarında oluşan şeker parçalanma ürünlerinin, aldol kondenzasyonu ile polimerleşmesi ve amino bileşikleri ile bağlanması sonucunda oluşmaktadır.

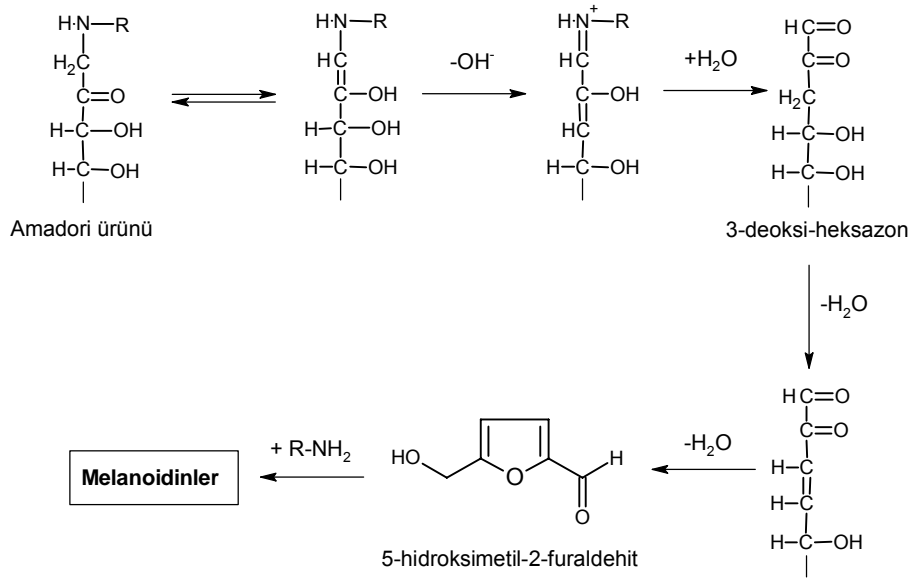
### **1.5. 5-hidroksimetilfufural (HMF)**

Isı işlemi gören ve depolanan gıdalarda, karbohidratların su kaybetmesi ile HMF oluşur ve bu oluşum uzun süre depo edilmiş ve ısıtılmış gıdalar için besinsel kalitenin düşmesinin bir göstergesidir (Murkovic ve Pichler 2006). HMF' nin kurutulmuş meyvelerde ve karamel ürünlerinde bazen 1 g/kg düzeyini aşan yüksek derişimlerde bulunduğu tespit edilmiştir. HMF' nin oluşumunun son zamanlarda daha çok incelenmesinin sebebi mutajen ve kanserojen olma ihtimalinin ortaya atılması ve üstelik özellikle bazı gıdalarda çabucak oluşup yüksek oranda birikmesidir. İnsanlar üzerindeki etkisi ve muhtemel tehlikeleri henüz açıklığa kavuşmamıştır. Fareler üzerinde yapılan denemelerde yüksek derişimlerinin gözlerde, üst solunum yollarında, deride ve mukoza zarında tahrişe neden olduğu ve ağız yoluyla alındığında öldürücü dozun 3.1 g/kg olduğu tespit edilmiştir (Janowski vd 2000).

HMF'nin oluşumu için genellikle kabul edilmiş olan tepkime yolu; indirgen şekerin amino asit ile glikosilamini oluşturması, oluşan glikosilaminin Amadori

düzenlenmelerine girerek bir aminoketozza dönüşmesi, Amadori ürünü aminoketozun enol formuna dönüşmesi ve dehidrasyonlarla HMF' yi oluşturması şeklindedir (Şekil 1.4) (Feather ve Nelson 1984, Ledl ve Schleicher 1990, Yaylayan ve Forage 1991, Ferrer vd 2002).

HMF genellikle gıdalarda ve model sistemlerde UV spektrofotometresi ile 284 nm' de tespit edilir (Akkan vd 2001, Giribet ve Ribas 2000). Ancak çok daha hassas bir yöntem olduğu için HPLC' de C18 kolonu ile analizler daha yaygın kullanılmaktadır (Morales ve Perez 1998, Artigas vd 1999, Jimenez vd 2000, Arena vd 2001, Mendoza vd 2002, Liu vd 2004, Ameer vd 2006). Son zamanlarda oldukça hassas ve kesinliği yüksek olduğu bildirilen GC-MS ile bir metot daha geliştirilmiştir (Teixidó vd 2006, Gentry ve Roberts 2004).



Şekil 1.4. HMF için genel olarak kabul edilen oluşum basamakları

## 1.6. Maillard Tepkimesinin Kinetiği

Bir kimyasal tepkimenin kinetik çalışması, o tepkimenin farklı faktörlerin etkisi altındaki hızı ve mekanizması hakkında bilgi edinmek için yapılan incelemedir. Bir tepkimenin hızı, belirli bir zaman aralığında bir tepkenin derişimindeki azalma veya bir ürünün derişimindeki artma şeklinde ifade edilebilir. Bir tepkimenin mekanizması ise tepkenlerden başlayıp ürünlerin elde edilmesine kadar devam eden tepkime basamakları dizisidir. Genel hız yasasına göre, tek tepkenli bir tepkimedey, tepkenin kullanılma hızı

$$-d[A]/dt = k[A]^n$$

eşitliğı ile verilir. Bu eşitlikte [A], tepken A'nın t zamanındaki derişimini, k tepkime sıcaklığındaki hız sabitini, n ise tepkime derecesini verir. Bir tepkimenin derecesi, o tepkimenin hızının, tepkenlerin derişimine bağılılığının şeklini gösteren bir parametredir. Tepkime hızının integrasyon yöntemi ile incelenmesinde tepkime derecesine sıfır, bir veya iki değeri verilerek yukarıdaki eşitliğin integrali alınır. Böylece, sıfır dereceden bir tepkimenin hız eşitliğı

$$[A] = [A]_0 - k t ;$$

birinci dereceden bir tepkimenin hız eşitliğı

$$\ln[A]_0/[A] = k t ;$$

ikinci dereceden bir tepkimenin hız eşitliğı de

$$1/[A] - 1/[A]_0 = k t$$

şeklinde elde edilir. Bu eşitliklerde [A]<sub>0</sub>, tepkenin t=0 zamanındaki başlangıç derişimidir. Kinetik çalışmalarda hesaplanmak istenen önemli bir faktör de tepkimenin çalışılan sıcaklıklar arasındaki aktivasyon enerjisidir. Hız sabiti ile aktivasyon enerjisi arasındaki ilişki Arrhenius eşitliğı ile verilir.

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

bu eşitlikte  $E_a$ , aktivasyon enerjisini;  $A$ , frekans faktörünü;  $T$ , sıcaklığı (K) ve  $R$  de ideal gaz sabitini göstermektedir.

Maillard tepkimesinin kinetiği, son zamanlarda uygulanan kompleks kinetik yöntemi dışında, genellikle basit kinetik yöntemle incelenmektedir (Martins vd 2001, Martins ve van Boekel 2003). Basit kinetik yöntem uygulamasında Maillard tepkimesinin kinetiği, kararma hızının takibi veya tepkenlerin kaybının takibi veya ürün oluşumunun takibi ile incelenmekte ve deneysel verilere sıfır, bir veya ikinci derece için türetilen hız eşitlikleri uygulanmaktadır. Bu bölümde, Maillard tepkimesini basit kinetik yöntemle inceleyen bazı çalışmalar özetlenecektir.

1976 yılında Warmbier vd, Maillard tepkimesinin hızına tepkenlerin derişim oranlarının etkisini 45°C’ deki kararmayı takip ederek incelemişlerdir. Kullandıkları model sistemde, glukoz/lisin molar derişim oranını 0,5’ ten 5’e kadar değiştirmişler ve kararmanın, molar derişim oranı 3 olduğunda en yüksek değerine ulaştığını, oranın daha fazla artırılmasının tepkime hızına etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Kararma 420 nm’ de yirmi günlük süre boyunca takip edilmiş ve yaklaşık bir günlük bir “induction period” aşamasından sonra absorbans değerlerinin zamanla doğrusal olarak değiştiği görülmüştür. Böylece kararma tepkime hızının sıfır dereceden olduğuna karar verilmiş ve ilgili hız sabitleri hesaplanmıştır.

Stamp ve Labuza (1983), 70, 80, 90, 100°C’ de glukoz/aspartam ve glukoz/lisin model sistemlerinde kararma oluşumunu takip etmişler ve kararmanın sıfır derece kinetiğine uygun olduğunu gözlemlemişlerdir. Glukoz/aspartam ve glukoz/lisin kararmalarında 70, 80, 90 ve 100°C’ de 420 nm’ de 0,1 absorbans birimine ulaşmak için gereken sürenin sırasıyla 11, 40, 5,3, 2,15, ve 1,0, 0,580, 0,250 ve 0,120 saat olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından glukoz/aspartam ve glukoz/lisin için hesaplanan aktivasyon enerjileri sırasıyla 22,0 kcal/mol ve 15,5 kcal/mol’ dür.

Glukoz/lisin sistemindeki kararar oluşunun Lee vd (1984) tarafından incelendiği çalışmada 90, 100 ve 110°C’ de tepkimeye pH’ ın etkisi araştırılmıştır. Yalancı birinci dereceden kabul edilen tepkimenin aktivasyon enerjisi 18,0 ile 5,1 kcal/mol arasında bulunmuştur.

Glukoz /lisin model sisteminde 35, 45 ve 55°C’ deki kararar oluşumu Petriella vd (1985) tarafından araştırılmış kararar tepkimesi sıfır derece kabul edilmiştir. Aynı tepkimenin 45°C’ deki HMF etimi Cerrutti ve arkadaşları tarafından incelenmiş fakat yeterli kinetik veri toplanamamıştır.

Narayan vd (1989) Maillard tepkimesinin kinetiğini lisin/glukoz-selüloz model sisteminde lisin kaybını inceleyerek araştırmıştır. 40, 50 ve 60°C’ de takip edilen lisin kaybının birinci dereceden olduğunu belirten araştırmacılar ayrıca lisin miktarının fazla olduğu durumlarda birinci dereceden sapmalar gözlemlemişlerdir.

Maillard tepkimesi için sıfırncı dereceden kinetiğin önerildiği diğer alışma Lerici vd (1990) ve Barbanti vd’ ne (1990) aittir. Lerici vd (1990) glukoz/glisin model sisteminin 70, 80 ve 90°C’ de girdiği Maillard tepkimesini 294 nm’ deki absorbansı ve CO<sub>2</sub> oluşumunu takip ederek incelemişler ve aktivasyon enerjilerini sırasıyla 120 kJ/mol ve 154 kJ/mol bulmuşlardır. Aynı çalışmada renk tayini incelemeleri de benzer sonuçlar vermiştir (Barbanti vd 1990).

Maillard tepkimesinin kinetiğinin HMF oluşumunun takip edilerek incelendiği bir araştırmada (Yaylayan ve Forage 1991), gerçek mekanizma veya tepkime basamakları gözardı edilerek genel tepkime yalancı birinci derece kabul edilmiş ve aktivasyon enerjisi 4.1 kcal/mol olarak sunulmuştur. Aynı araştırmacılar triptofanın glukoz ve mannozla girdiği tepkime için de yine birinci dereceden kinetik önermişlerdir (Yaylayan ve Forage 1992).

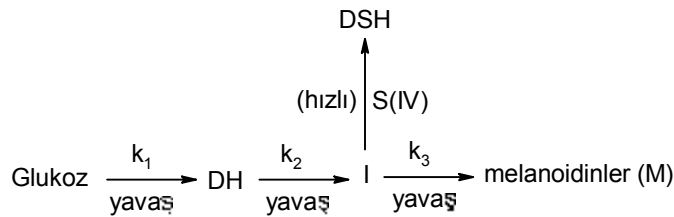
HMF oluşumu, glukozun 85, 90, 95 ve 100°C’ de aspartik asit, glutamik asit ve asparaginle girdiği Maillard tepkimelerinde de incelenmiştir (Giribet ve Ribas 2000).

Tepkime sıfırncı dereceden bulunmuş ve model sistemler için aktivasyon enerjilerinin 124 kJ/mol ile 134 kJ/mol arasında olduğu bildirilmiştir.

1994 yılında Maillard tepkimesi Peterson ve arkadaşları tarafından kinetik çalışmalar için özel olarak geliştirilen ve bir spektrofotometreye bağlı olan bir mikrodalga ısıtma sistemi kullanılarak incelenmiştir. Glukoz/prolin sisteminin çalışıldığı bu araştırmada da kararma takip edilmiş ve aktivasyon enerjisi 36,03 kcal/mol olarak bulunmuştur.

600 MPa'lık atmosfer basıncı koşulunda ve farklı pH değerlerinde glukoz/lisin çözeltilerinin girdikleri Maillard tepkimelerinin kinetiği ise Hill vd (1996) tarafından 40 - 60°C arasında çalışılmıştır. 420 nm'deki absorbans sonuçları sıfırncı dereceden hız sabitlerini elde etmekte kullanılmıştır. Bu araştırmacılar pH'nın 7,0 - 7,5'ten fazla olduğu durumlarda yüksek basıncın Maillard tepkimesinin hızını arttırdığını fakat düşük pH değerlerinde yüksek basınç uygulanmasıyla renk oluşumunun gerilediğini gözlemlemişlerdir.

Maillard tepkimesinde kararma kinetiğinin incelenmesinde Wedzicha ve arkadaşları ilginç bir yöntem geliştirmişler ve bu yöntemi çeşitli model sistemlere uygulamışlardır (Davies vd 1997, Molero-Vilchez ve Wedzicha 1997, Göğüş vd 1998, Leong ve Wedzicha 2000, Mundt ve Wedzicha 2003). Bu yöntemle kararma oluşumu, tepkenlere bağlı olarak birbirini takip eden iki veya üç hız tayin edici basamaklı mekanizmalarla açıklanmıştır. Örneğin glukoz/glisin model sisteminde pH 5.5 ve 55°C sıcaklık koşullarında, kararma tepkimesi için aşağıdaki üç hız tayin edici basamaktan oluşan mekanizma önerilmiştir (Mundt ve Wedzicha 2003, Davies vd 1997).



Burada DH, glukozun girdiği kararma tepkimesinin anahtar araürünü olan 3-deoksiheksosulosu, I, belirtilmeyen bir ara ürünü, S(IV) bir sülfid türünü ve DSH da 3,4-dideoksi-4-sulfoheksosulosu simgelemektedir. Kabul edilen yaklaşıma göre S(IV) varlığında, glukoz/glisin tepkimesi kısmen tepkimez olan DSH üretimine yönelmekte fakat S(IV)'ün yokluğunda tepkime melanoidinlerin üretimi yönünde devam etmektedir. İlk iki basamağın hızları S(IV)'ün varlığından etkilenmektedir. Böylece bir glukoz-glisin-S(IV) tepkimesinde S(IV)'ün tepkime hızı, hız sabitleri  $k_1$  ve  $k_2$ 'nin elde edilmesine yol açmaktadır. Glukoz ve glisin derişimlerinin birbirine yakın fakat S(IV) derişiminden çok daha fazla olduğu durumda, tepkime basamakları için yazılan hız eşitliklerinin integralleri alınıp S(IV) derişimi için aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.

$$[S(IV)] = [S(IV)]_0 - k_1 t + k_1/k_2 (1 - e^{-k_2 t})$$

Model sisteme eklenen S(IV) derişimindeki sülfid türünün, tepkime süresince elde edilen derişim-zaman verileri nonlinear regresyon analizi ile yukarıdaki eşitliğe uydurularak  $k_1$  ve  $k_2$  hız sabitlerinin 55°C' deki değerleri bulunmuştur. Diğer taraftan önerilen mekanizmada S(IV)'ün ortamda bulunmadığı durumlar için yazılan hız eşitliklerinin ardı ardına integralleri alınarak, melanoidinlerin (M) derişimi için aşağıdaki eşitlik türetilmiştir.

$$[M] = k_1 t - (k_1/k_2) - (k_1/k_3) + (k_1 k_3/k_2(k_3 - k_2)) e^{-k_2 t} - (k_1 k_2)/k_3(k_3 - k_2) e^{-k_3 t}$$

Bu eşitliğin  $A = [M] \varepsilon$  da kullanılmasıyla deneysel olarak kararma için elde edilen absorpsiyon-zaman verileri, daha önce hesaplanan  $k_1$  ve  $k_2$  değerlerinin yerine koyularak nonlinear regresyon analizi ile  $k_3$  ve  $\varepsilon$  değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Özetlenen çalışmada  $k_1$ ,  $k_2$  ve  $k_3$  değerleri sırasıyla  $7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ saat}^{-1}$ ,  $0,17 \text{ saat}^{-1}$  ve  $0,0874 \text{ saat}^{-1}$  olarak sunulmuştur.

Buraya kadar bahsedilen çalışmalarda Maillard tepkimesi basit kinetik yöntemlerle incelenmiştir. Son yıllarda özellikle van Boekel vd tarafından çoklu cevap

modelleme tekniklerinin kullanıldığı kompleks kinetik yöntemler geliştirilmektedir (Martins vd 2001, Martins vd 2003<sup>a</sup>, Martins ve van Boekel 2003<sup>b</sup>, Martins ve van Boekel 2005<sup>a</sup>, Martins ve van Boekel 2005<sup>b</sup>). Buradaki “cevap” ın anlamı, değiştirilen herhangi bir faktör sonucunda tepkenlerin ve ürünlerin derişimlerdeki değişimdir. Kompleks kinetik yöntemlerin uygulanmasında incelenen sistem için kompleks bir tepkime mekanizması önerilmekte ve mekanizmanın her bir basamağı için kinetik diferansiyel denklemler yazılmaktadır. Çok sayıdaki diferansiyel denklemin analitik olarak çözümü çok zor olduğundan, denklemler hazır yazılım programları kullanılarak nümerik integrasyon yoluyla çözülmektedir. Sıcaklık gibi herhangi bir dış faktörün tepkimeye etkisi incelenirken, tepkenlerin, ürünlerin ve ara ürünlerin derişimlerdeki değişimler takip edilmekte, bunların derişim-zaman verileri ile nümerik integrasyon sonunda elde edilen çözüm eşitlikleri arasındaki uyum test edilmektedir. Uyumun iyi olmadığı basamaklar göz önüne alınarak önerilen kompleks kinetik modelde modifikasyonlar yapılmakta ve yukarıdaki işlemler tekrarlanarak yeni uyumlar test edilmektedir. Uyum testi için çok değişkenli test önerilmektedir. Yazılım programlarında yer alan bu test tekrar deneylerine dayanmaktadır. Burada deneysel verilerin kalitesi çok önemlidir. Deneysel verilerdeki saçılma yüksek olduğunda, prensipte, her kinetik modele uyum sağlanır. Ancak deneysel hata küçük olduğunda verilerin modele uyumu hakkında daha iyi bir tahmin yapılabilmektedir (Martins vd 2001). Kompleks kinetik yöntemi 2005 yılında glukoz/glisin modeline pH 6.8 ortamında uygulanmıştır (Martins ve van Boekel 2005<sup>a</sup>). İlk önce, ısıtılan glukoz/glisin sistemlerindeki tepkime ürünleri tanımlanarak miktarları tespit edilmiştir ve temel tepkime basamakları belirlenmiştir. Kararmanın oluşumunda N-(1-deoksi-D-fruktoz-1-il) glisinin (DFG) önemi ve bu maddenin, Maillard tepkimesinin ilk basamaklarındaki geri dönüşebilirliği çalışılmıştır. Çoklu cevap modelinin gücünü göstermek için kinetik modelleme işleminin model önerme, deneylerle bu modeli test etme, gereken yerlerde modeli modifiye etme ve yine deneylerle modifiye edilmiş modeli test etme uygulamaları başarılı bir model elde edilinceye kadar tekrar edilmiştir. Önerilen model daha sonra beş farklı sıcaklıkta (80, 90, 100, 110 ve 120°C) test edilerek tepkime basamakları için hız sabitleri ve aktivasyon enerjileri elde edilmiştir. Bu araştırmacıların model sistemleri ısıtma süreleri sadece 200 dakika olduğundan ve önerdikleri mekanizmada HMF ve diğer bazı bilinmeyen ara ürünler için tepkime



basamakları gösterilmediğinden glukoz/glisin arasındaki Maillard tepkimesinin kinetiğinin hala tam olarak belirlendiği söylenemez.

Maillard tepkimesinin kinetiği, model sistemler dışında doğrudan gıdaların kullanılmasıyla da çalışılmıştır. Örneğin Kılıç vd (1997) kaşar peynirinde 20 ve 40°C’ de kararmayı takip ederek sıfırncı dereceden kinetik eşitlikleri kullanmış ve aktivasyon enerjisinin 15,1 ile 22,3 kcal/mol arasında olabileceğini bildirmiştir. Arena vd (2001) portakal suyunda HMF oluşumunu inceleyerek yalancı birinci dereceden kinetik önermiştir. Ramirez-Jimenez vd (2001) dilimlenmiş ekmekteki kararmaya kızartma süresinin etkisini araştırmıştır. Buglione vd (2002), 10 – 30°C depolama sıcaklıkları arasında üzüm suyunda yirmi hafta boyunca oluşan kararmayı gözlemlemiş, kararmanın 11. haftaya kadar yalancı birinci derece, 11. haftadan sonra sıfır derece kinetik ile gerçekleştiği sonucuna varmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda HMF oluşumu da takip edilmiş ve HMF’ nin birinci dereceden bir tepkime ile oluştuğu rapor edilmiştir. Mendoza vd (2003) ise reçellerde ve meyveli bebek mamalarında 20 ve 35°C’ de, 12 ay boyunca HMF oluşumunu araştırmış, yüksek sıcaklıkta bu gıdalarda daha fazla HMF biriktiğini gözlemlemiştir. Gıdalarda HMF oluşumunun incelendiği bir başka araştırma da Gentry ve Roberts’ e (2004) aittir. Elma şirasının pastörizasyonu sırasında HMF oluşumunun görünen sıfırncı dereceden bir tepkime ile gerçekleştiğinin açıklandığı bu çalışmada aktivasyon enerjisinin değeri 27,3 kJ/mol olarak verilmiştir.

### **1.7. Faktöriyel Deneme Deseni**

Faktöriyel denemelerde birden fazla faktörün değişik seviyeleri aynı anda denemeye alınmak suretiyle faktörler arasında karşılıklı etkileşim olup olmadığı ortaya çıkarılabilmektedir. Denemenin planı faktöriyel değildir. Ancak faktörlerin bir arada bulunması faktöriyel düzen içinde olur. Yani 1. faktörün her seviyesinde 2. faktörün her seviyesi denemeye alınır. Faktör, ilgili muameleler (sıcaklık, katalizör, nem seviyesi, pH vs.) veya sınıflamalar serisidir. Faktöriyel düzenlemede denemenin büyüklüğü; faktör sayısı, her faktörün seviye sayısı ve tekrarlar bağılıdır. Faktöriyel denemeler bütün araştırma alanlarında büyük öneme sahiptir. Örneğin kimyasal bir tepkimede oluşan bir ürünün miktarı, başlangıç derişimlerinin oranına, kullanılacak katalizöre, pH’

ya, sıcaklığa, bazı tepken maddelerin saflık derecesine, belki su aktivitesine vs bağılı olabilir. Bu durumda bu etkilerin değişik seviyelerine bağılı olarak farklı miktarlarda ürün oluşumu gerçekleşecektir. Faktöriyel denemeler yoluyla bu faktörlerden bir kaçını aynı anda ve değişik seviyelerde incelemek, tepkimenin daha iyi bir şekilde tanımlanmasını sağlayacaktır (Brereton, 1990).

### **1.8. Araştırmanın Amacı**

Bu çalışmanın amacı, model sistemler yardımıyla Maillard tepkimesinde kararmanın ve HMF' nin oluşma kinetiğinin FTIR, UV ve HPLC yöntemleri kullanılarak araştırılmasıdır. Model sistemler, glukozun yanında bir amino asidi veya aynı amino asidin dimeri, trimeri veya tetramerinden oluşturulacak ve bu tepkenlerin Maillard tepkimesindeki aktiflikleri incelenecektir.

## **2. MATERYAL VE METOD**

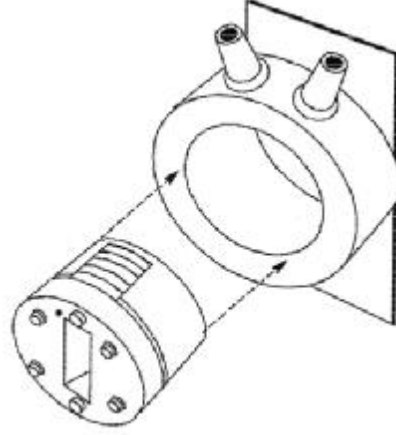
### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler**

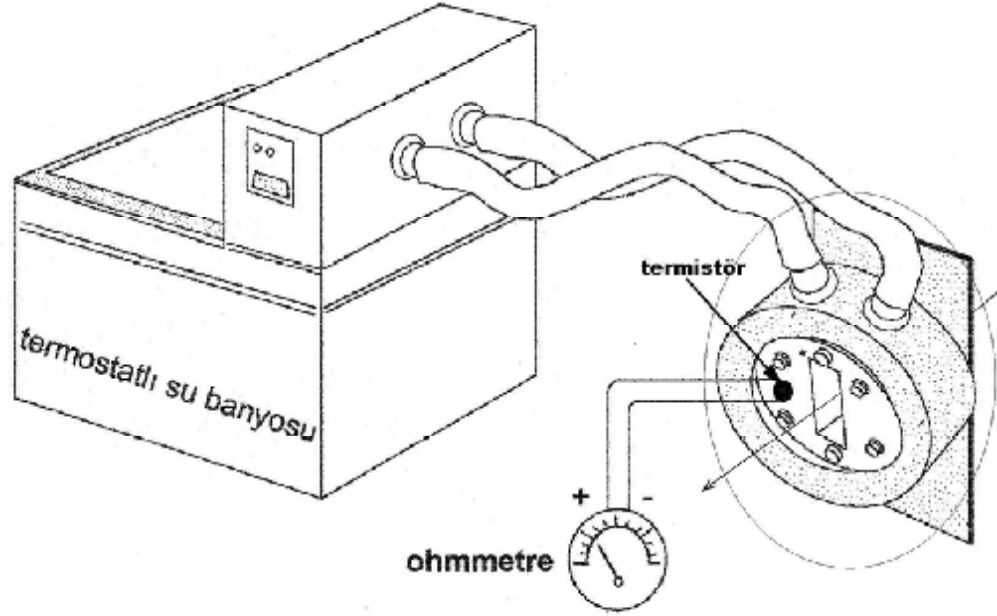
Maillard tepkimesinin model sistemlerini hazırlamak için kullanılan kimyasal maddelerden L-lisin, lyslys, lyslysys, L-alanin, aspartil-aspartik asit, glisin, glyglygly, glyglyglygly ve standart madde olarak glisin anhidrit Sigma'dan, L-aspartik asit ve 5-hidroksimetil-2-furaldehit (HMF) ABCR' den, L-serin ve glygly Fluka'dan, Glukoz, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, fosforik asit HPLC saflıkta metanol, asetonitril ve su Merck firmasından temin edilmiştir. Kimyasalların hepsi %99 saflıktadır ve daha ileri saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmışlardır. Bütün denemelerde deiyonize su kullanılmıştır.

#### **2.1.2. Deneylerde kullanılan cihazlar ve ekipmanları**

Tartımlar Chyo JL-200 marka terazide alınmış ve pH ölçümleri için de JENWAY 3040 Ion Analyser marka pH-metre kullanılmıştır. FTIR spektrometresinde yapılan ölçümler için CaF<sub>2</sub> pencereci sızdırmaz sıvı hücresi (25 µm) Specac firmasından temin edilmiştir. Bu hücrenin yerleştirilebileceği ölçülere sahip ve sabit sıcaklık ortamı sağlayacak ısı ceketini Akdeniz Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Atölyelerinde özel olarak yaptırılmıştır (Şekil 2.1). Çözelti karışımlarının sabit sıcaklıkta ısıtılmasında Grant W14 marka termostatlı su banyosu kullanılmıştır. Aynı su banyosu, ısı ceketine hortumlar aracılığıyla bağlandığında, suyun hücre etrafında dolaşmasını sağlayan bir sisteme sahip olduğundan, FTIR ölçümlerinde de kullanılmıştır (Şekil 2.2). Çalışma esnasında, hücrenin, ısı ceketinin ve su banyosundaki suyun sıcaklığını hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi için THERMO (France) marka ( $\pm$  0,5 hassasiyette) bir dijital termometre kullanılmıştır. FTIR ölçümleri için MATTSON 1000 FTIR spektrometre, tepkimede açığa çıkan HMF ve karamanın



Şekil 2.1. FTIR' da kullanılan sızdırmaz ısıtılabilir sıvı hücre ve ısı ceketini.



Şekil 2.2. FTIR' da kullanılan ısıtma sistemi. (daire içine alınan kısım FTIR'ın numune bölmesine yerleştirilmiştir)

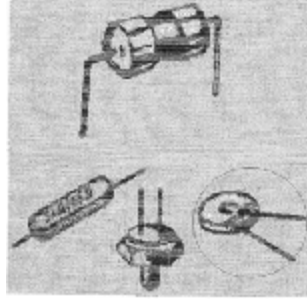
absorbanslarını ölçmek için CARY 100 Bio UV-Vis spektrofotometre ve yine oluşan HMF düzeyini kromatografik olarak belirlemek için Agilent 1100 marka, vakum degasser, quaterner pompa, auto-sampler ve DAD gibi ekipmanlara sahip HPLC ve yine Agilent Technologies firmasından alınan Hypersil ODS-C18 (4,0 x 250mm, 5µm) kolonu ile “auto-sampler” cihazının çalışmasına uygun septum kapaklı minik şişeler (vial) kullanılmıştır.

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Tepkimenin FTIR spektrometresi ile çalışılması

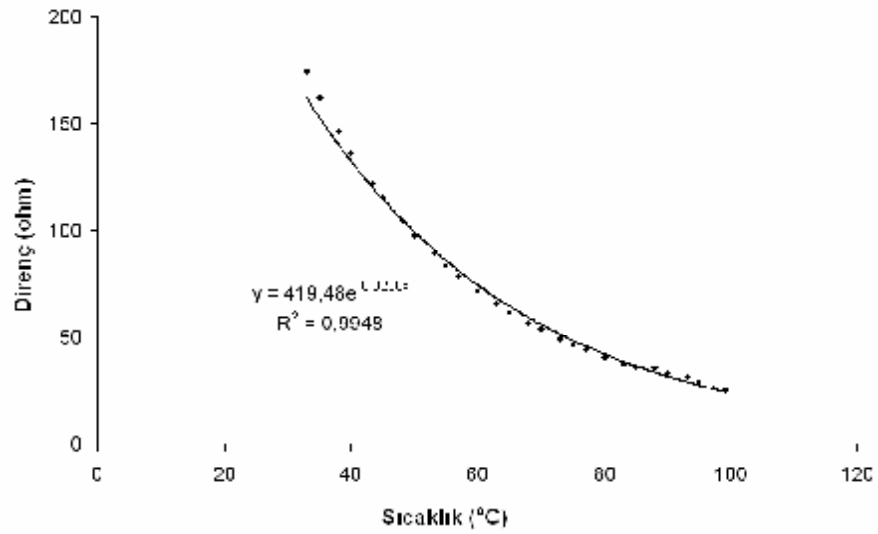
Şekil 2.1 deki sızdırmaz ısıtılabilir sıvı hücre ve ısı ceketini FTIR spektrometresinin numune bölümüne yerleştirilmiş ve Şekil 2.1 de görüldüğü gibi termostatlı su banyosuna bağlanmıştır. Deneyler sırasında, hücre yerine yerleştirilmeden önce termostatlı su banyosu istenen sıcaklığa ayarlanmış ve ısı ceketini sabit sıcaklığa ulaştığı zaman, hazırlanan aminoasit ve glukoz karışımları hücreye bir enjektör yardımıyla içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yüklenmiş, sıkıca vidalanmış ve FTIR' ın numune bölümüne yerleştirilmiş ve tepkimenin çeşitli zaman aralıklarında spektrumları alınmıştır.

Isıtma sisteminde aradaki hortumlardan ve ısı ceketini ile hücrenin oluşturduğu katmanlardan ısı kayıpları olacağından, sonuçta çözeltinin sabit kaldığı sıcaklık su banyosunun termostatının ayarlandığı sıcaklıktan düşük olacaktır. Bu nedenle su banyosundaki suyun ayarlandığı sıcaklık ile hücrenin sabit kaldığı sıcaklık arasındaki farkın bilinmesi gerekmektedir. Fakat hücrenin içindeki sıvının sıcaklığını ölçmek, CaF<sub>2</sub> diskler arasındaki mesafe 25 µm olduğu ve hücre sıkıca kapatılmış olduğu için mümkün değildir. Hücrenin ulaştığı ve sabit kaldığı sıcaklığı tespit etmek için hücrenin dış kısmına bir termistör (sıcaklık arttıkça direnci artan veya azalan elektronik bir devre elemanı) yerleştirilmiştir (Şekil 2.3). Termistörün kutupları da bir ohmmetreye bağlanmıştır. Kullanılan termistör direnci sıcaklıkla azalan tiptedir. Bu sistem elemanını



Şekil 2.3. Dört farklı termistör tipi (daire içine alınan bu çalışmada kullanılan termistör tipidir).

su banyosu ile kalibre etmek amacıyla öncelikle termistör su banyosundaki suya batırılmış, termostat belirli sıcaklıklarda sabit tutulmuş ve bu sıcaklık değerlerinde direncin sabit kaldığı değerler tespit edilmiştir. Sıcaklığa karşı direnç verileri, bu verilerin belirttiği regresyon analiziyle belirlenen en uygun fonksiyon ile regresyon katsayısının karesi Şekil 2.4' te verilmiştir.



Şekil 2.4. Termistörün sıcaklık-direnç değişimi grafiği

FTIR spektrometresinde saf suyun, saf glukozun, saf alaninin spektrumları alınmıştır. Ayrıca Maillard tepkimesinin takibi için alanin/glukoz sistemi, aşağıdaki koşullarda incelenmiştir.

0,05M Alanin/0,05M Glukoz (1/3, pH 9,5 , 55°C)  
0,05M Alanin/0,05M Glukoz (1/3, pH 7, 50°C)  
0,3M Alanin/0,3M Glukoz (1/3, pH 7, 27°C)  
0,1M Alanin/0,1M Glukoz (1/3, pH 2,3 , 40°C)  
0,1M Alanin/0,1M Glukoz (1/3, pH 6, 28°C)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 9,5 , 68°C)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 33°C)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 33°C, etil asetat ortamında)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 33°C, etanol ortamında)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 33°C, gliserol ortamında)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 33°C, propilen glikol ortamında)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 15°C)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 18°C)

### 2.2.2. Tepkimenin UV-Vis spektrofotometresi ile çalışılması

Deneylerde kullanılan spektrofotometrede, küvetlerin yerleştirildiği bölme sıcaklık kontrolü sağlayabilen sisteme sahip ve manyetik karıştırıcılı olduğundan tepkime karışımları küvete doldurulduktan sonra teflon kapakları kapatılmış ve ayarlanan sıcaklıklarda sabit tutularak çeşitli sürelerde çözeltinin 284 nm' deki spektrumları kaydedilmiştir. UV-Visible spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar aşağıda gösterilmiştir. Tüm deneyler üçer kez tekrar edilmiştir. pH ayarlamaları için fosfat tamponu kullanılmıştır.

0,5M Lysin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,5M Lysin/0,5M Glukoz (1/3, pH 6, 35, 45 ve 55°C)  
0,029M Lyslys/0,029M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,0124M Lyslyslys/0,0124M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,5M Aspartik asit/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,04M Aspartil-aspartik asit/0,04M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,5M Serin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)  
0,5M Alanin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)

0,5M Glisin/0,5M Glukoz (1/3, pH 7, 35, 45 ve 55°C)

### 2.2.3. Tepkimenin HPLC ile çalışılması

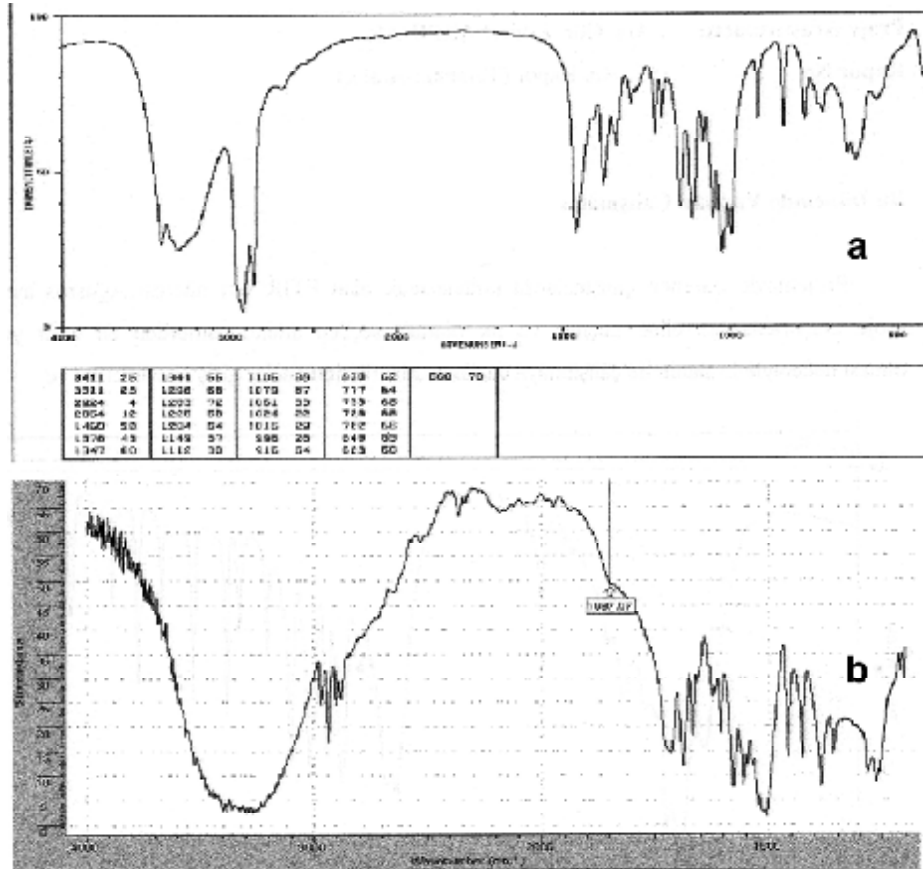
HPLC, Maillard tepkimesinde HMF oluşumunu 284 nm' de ve kararma oluşumunu da 420 nm' de takip etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada 0,5M glisin, 0,5M glygly, 0,5M glyglygly ve 0,5M glyglyglygly' nin her birinin ayrı ayrı 0,5M glukoz ile 1/3 derişim oranında, pH 5,5' ta ve 70, 80, 90, 100, 110°C' deki tepkimeleri incelenmiştir. Her bir tepkime çözeltisinden her bir sıcaklıkta, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dakikalık süreler sonunda 1-1,5 ml' lik örnekler alınarak hemen derin dondurucuya koyulmuş ve daha sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Analizler için kullanılan kolon C18 (4.0 x 25 mm, 5µm), kolon sıcaklığı 30°C, kolon basıncı 180 bar ve kolona verilen enjeksiyon hacmi 5µl' dir. Örneklerin HMF analizi %20 metanol, %80 asetat tamponu (0,04M sodyum asetat, pH 3,6) içeren hareketli fazla 1 ml/dak akış hızında isokratik olarak gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlar DAD ile kaydedilmiştir. HPLC cihazında Chemstation yazılımı ile çalışılmış, kromatogramların görüntülenmesi, değerlendirilmesi ve kalibrasyon yine bu yazılım yardımıyla yapılmıştır. HMF' nin standart çözeltileriyle hazırlanan çalışma grafiğinden ( $r = 0,99938$ ) tepkime karışımlarının içerdiği HMF miktarı tespit edilmiştir. Her bir deney üç kez tekrar edilmiştir. Tepkimeye giren farklı madde türleri, sıcaklık ve ısıtma süresi arasındaki farklılık, faktöriyel deneme deseninde (4x4x6), çok yönlü ANOVA ile SAS yazılımı kullanılarak istatistik olarak analiz edilmiştir. Derişim değerlerine doğal logaritma dönüşümü uygulanarak normal bir dağılış elde edilmiştir ( $p>0,01$ ).



### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

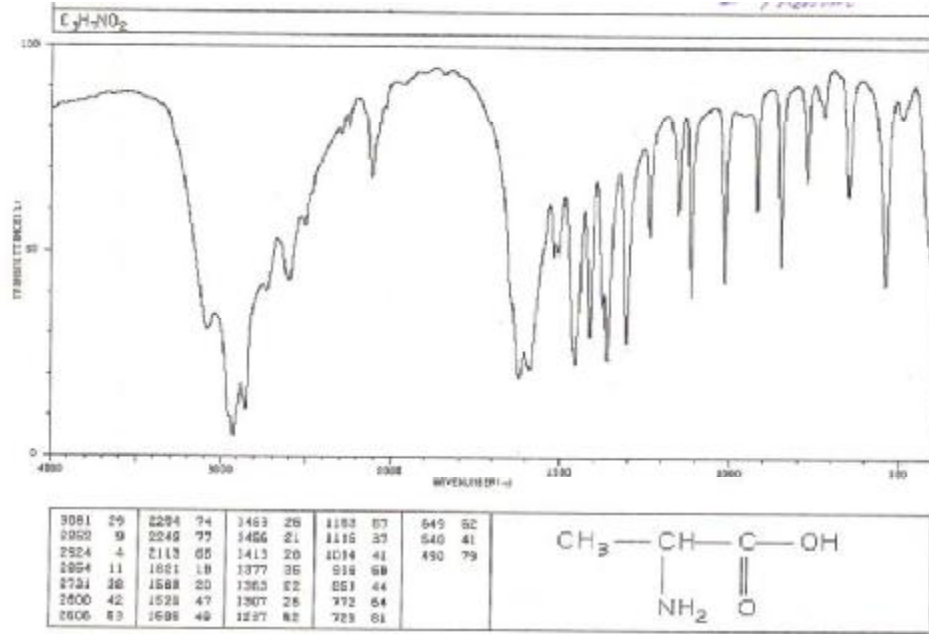
#### 3.1. FTIR Spektrometresi ile Yapılan Çalışmalar

Maillard tepkimesinin FTIR ile çalışılması planı yapılırken spektrumlarda tepkenlere ait bazı piklerde azalma veya ürün oluşumuna ilişkin bazı yeni piklerin doğrudan gözlenebileceği ve takip edileceği öngörülmüştür. İncelenecek model sistem alanin ile glukoz arasındaki Maillard tepkimesidir. Şekil 3.1a saf glukozun nujoldaki FTIR spektrumunu göstermektedir. Şekil 3.1b’de ise saf glukozun bu araştırmada çekilen KBr’deki spektrumu verilmiştir.



Şekil 3.1. Saf glukozun nujolda (a) ve KBr’deki (b) spektrumu

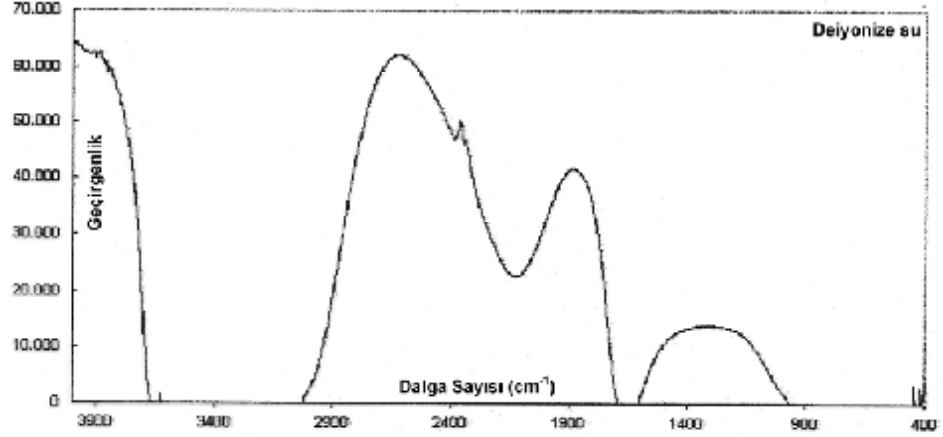
Bu spektrumlarda glukozun fonksiyonel grubu olan aldehit karboniline ait belirgin bir pik görülmemektedir. Bunun nedeni büyük bir olasılıkla ortam koşullarına bağlı olarak glukozun belirli bir yüzdesinin halkalı yapıda olmasıdır. Şekil 3.2’ de literatürden alınan saf L-alaninin spektrumu görülmektedir. Alaninin amino grubuna ait N-H gerilme bandı 2900–3100  $\text{cm}^{-1}$  arasında geniş bir pik olarak görülmektedir.



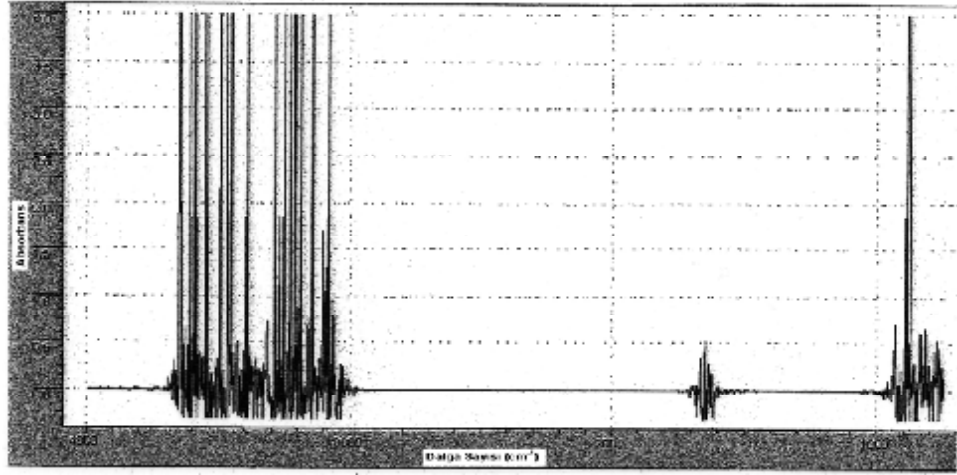
Şekil 3.2. Saf alaninin FTIR spektrumu

Araştırmada incelenecek tepkimeler sulu ortamda gerçekleştirileceğinden saf suyun da FTIR spektrumu alınmıştır. Şekil 3.3’ de suyun soğurma bölgeleri gösterilmektedir. Spektrometrede bir madde cihaz tarafından referans madde olarak kaydedildiği zaman ona ait veriler kaydedilir ve eğer yine hiçbir değişiklik olmaksızın tekrar aynı maddenin spektrumu alınır, teorik olarak sadece “baseline” çizgisini vermelidir. Bu bir çok maddede rahatlıkla gözlenmektedir ama bu uygulama su için yapıldığında Şekil 3.4’ deki sonuç elde edilmiştir. Görüldüğü üzere suyun geniş O-H gerilme ve eğilme bantlarının bulunduğu üç bölgede bir takım karmaşık sinyaller mevcuttur. Deneylerde kullanılacak saf glukozun ve alaninin sulu çözeltisinin FTIR spektrumları Şekil 3.5a’ da verilmektedir. Bu spektrumlarda 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülen karmaşık pikler Şekil 3.4’ de gözlenen suya ait O-H eğilme bantları bölgesine

denk gelmektedir. Maillard tepkimesi devam ederken FTIR spektrumunda tepkenlere ait belirgin bir değişimin gözlenip gözlenemeyeceğini anlamak için bir dizi

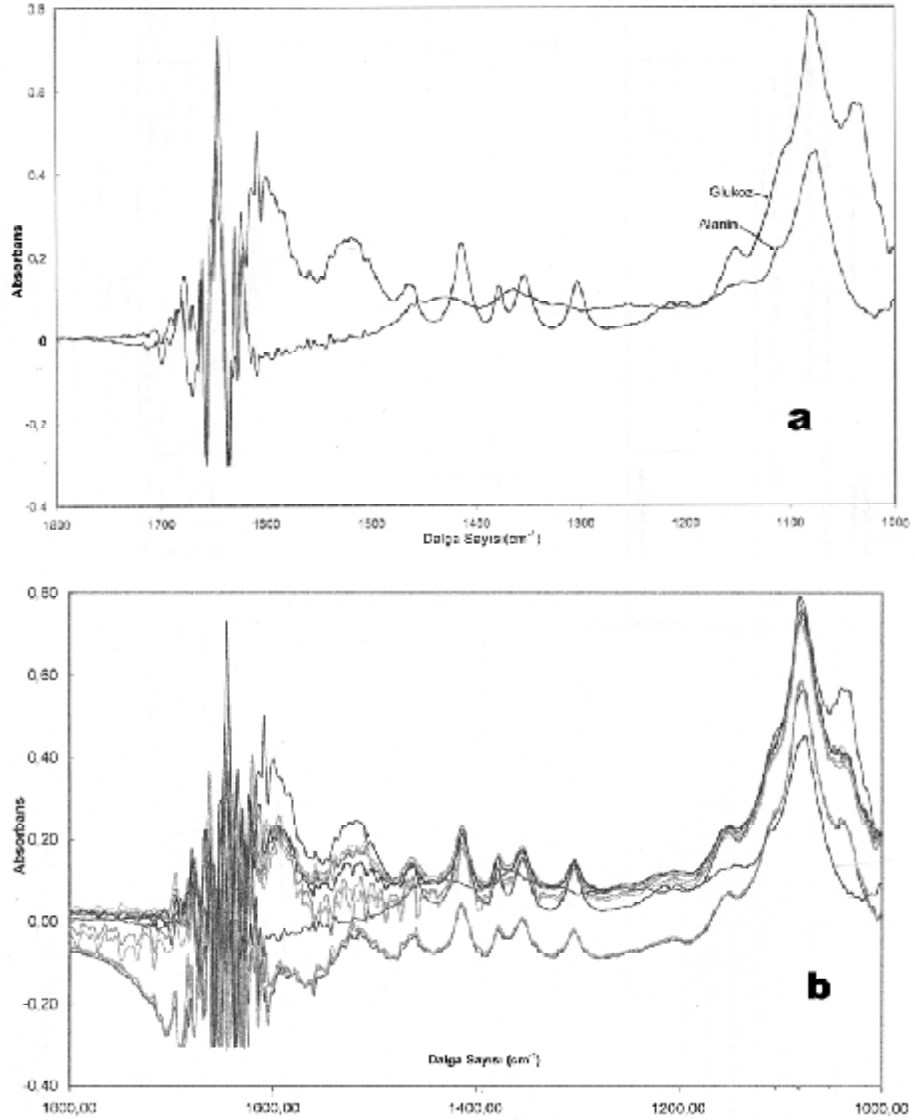


Şekil 3.3. Saf suyun IR spektrumu



Şekil 3.4. Referans olarak suyun kaydedildiği bir su spektrumu

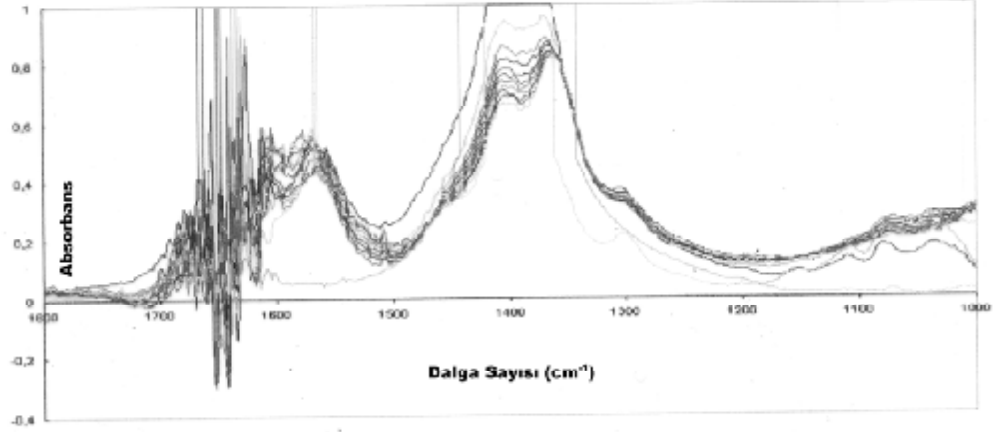
denemeler yapılmıştır. Bunlardan biri 0,5M alanin ve 0,5M glukoz karışımının pH 7 ve 33°C' da 10 saat süreyle ısıtıldığı denemedir. Bu çözeltinin birer saat arayla çekilen FTIR spektrumları Şekil 3.5b de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi spektrumlarda tepkenlere ait piklerde takibe değer bir azalma olmamıştır. Ayrıca, ürün oluşumunun göstergesi olabilecek yeni ve zamanla miktarı artan pikler de gözlenememiştir. Bu durum, farklı pH ve sıcaklıklarda yapılan denemelerde de değişmemiştir (Şekil 3.6).



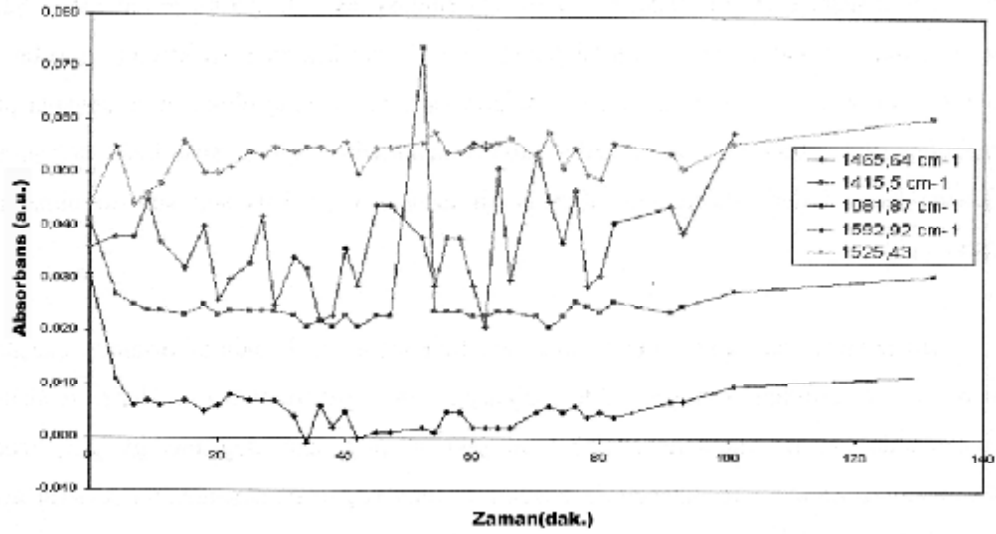
Şekil 3.5. Saf glukozun ve alaninin spektrumu (a). Alanin/glukozun pH 7 ve 33 °C' de 10 saatlik ısıtma süresinde kaydedilmiş olan spektrumları (b)

Üst üste karşılaştırıldığı zaman aynı spektrumların sadece azar azar yukarıya veya aşağıya doğru ötelendiği bir görüntü veren bu spektrumlarda, bazı pikler seçilerek absorbans değişimleri zaman karşı grafiğe geçirildiği zaman düzenli bir artma veya azalma da gözlenmemiştir (Şekil 3.7). Seçilen çeşitli piklerdeki absorbans-zaman grafiklerinin bu şekilde ortaya çıkmasında en büyük nedenin Maillard tepkimesinin karmaşıklığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tepkime adımlarının birbirine paralel

ve ardışık olarak sürekli gelişmesi ve dolayısıyla tepkime karışımında her an, gerek tepkimeye girmemiş maddelerin, gerek ürünlerin bir arada olması ve bunlar arasında birçok dengelerin oluşması bu sonucu geliştirmiştir.



Şekil 3.6. Alanin ve glukozun pH 9' da 65-68 °C' de 35-40 dakikada bir kaydedilmiş olan spektrumları



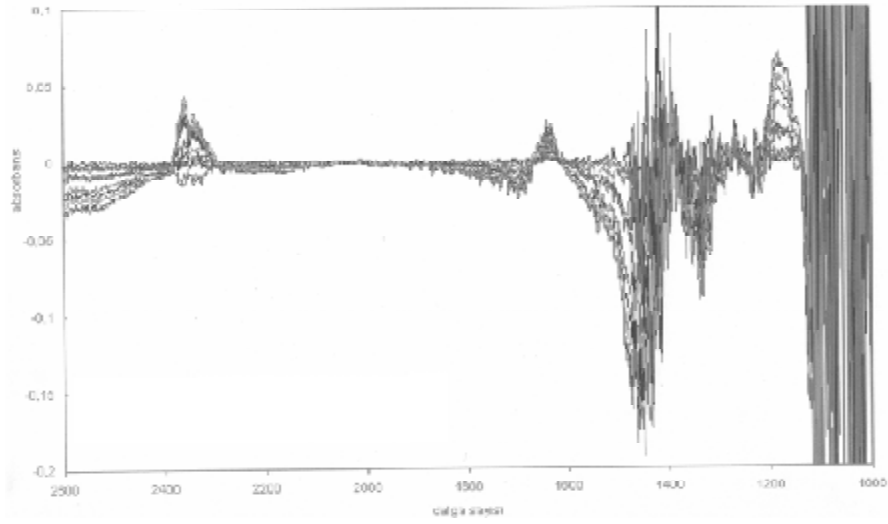
Şekil 3.7. Seçilen çeşitli piklerdeki absorbans değişimi

Çözeltilerin ısıtılma sürelerinin başlarında spektrumlarında pek fazla bir değişim zaten beklenemez. İlk tepkime adımlarında oluşan Schiff bazının başlangıç maddelerinden farkı sadece bir mol suyun ayrılmasıyla bir imin bağının oluşmasıdır. Sonrasında, Amadori düzenlenmelerinde aldoz formu ketoza dönüşecektir ve yine oluşan ürünlerin, atomlarının türü ve bağlanmaları bakımından IR spektrumu ile gözlenebilecek farklılıklar gösteremeyeceği zaten düşünülmüştür. Ancak tepkime süresinin uzadığı ve özellikle renkli bileşiklerin oluşup melanoidinlerin derişimleri artmaya başladığında, heterohalkalı ve çoğunlukla konjuge çift bağlı yapılar nedeniyle spektrumlarında farklı ve yeni oluşan piklerin gözlenebileceği ve Fayolle vd (2000) ve Sivasundaram vd (2002) tarafından önerildiği gibi bilgisayar yazılımları yardımıyla bazı sayısal analizleri ve istatistik yaklaşımları kullanarak bu bilgilerin değerlendirilebileceği bekleniyordu. Fakat yorumlanması kolay olmayan spektrumlar bu yönde bir takibi olanaksız hale getirmiştir. FTIR spektrumlarının Maillard tepkimesinin takibi için yeterli olmayışlarının bir nedeni de tepkimelerin sulu çözeltide çalışmasıdır. Suyun hem kendi içindeki hidrojen bağlarının çokluğu ve hem çözeltideki maddelerle yaptığı hidrojen bağlarının da etkisiyle, IR spektrumlarında suyun soğurma yaptığı bölgelerde çok karmaşık görüntüler ortaya çıkmış ve bu bölgelerde tepkimede oluşan maddelere ait herhangi bir değişimi izleme olanağı ortadan kalkmıştır. Materyal kısmında belirtildiği gibi, çözeltilerin bulunduğu hücrenin diskleri arasındaki uzaklık 25µm' dir. Böylece hücreye enjekte edilen çözelti 25 µm kalınlığında olmaktadır. Deneysel sonuçların yorumlanmasındaki sorunların, daha küçük çözelti kalınlıklarında bu kadar önemli olmayacakları düşünülmektedir.

Maillard tepkimesinin FTIR ile takibinde suyun spektrumlardaki etkisini ortadan kaldırmak için tepkime gliserol ortamında da incelenmiştir. Şekil 3.8' de, alanin/glukoz tepkimesinin 50°C' de, gliserol ortamında alınan FTIR spektrumları verilmiştir. Gliserolün viskozitesinin fazla olmasından dolayı moleküler hareketler de yavaşlayacağından, genelde gliserol ortamında tepkimenin çok yavaş geliştiği gözlenmiştir. Bu nedenle tepkime karışımı beş gün boyunca izlenmiştir. Şekil 3.8' deki spektrumlara bakıldığında belirli bantlarda zamanla artma veya azalma gözlenebilmektedir. Ancak gliserol ortamındaki bu tepkimenin, gıdalarda ve organizmada su varlığında oluşan gerçek Maillard tepkimesini yansıtmadığı dolayısıyla

daha farklı mekanizmayla farklı ürünler oluşturabileceği düşüncesiyle bu denemeler daha fazla yapılmamış, fakat daha önce sunulan spektrumlardaki karmaşıklığın büyük oranda suyun varlığından kaynaklandığının göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada, Maillard tepkimesi model sistemlerinin FTIR ile takibinin, oluşturulan koşullar altında tatmin edici ve incelemeye değer sonuçlar vermediği anlaşılmıştır.



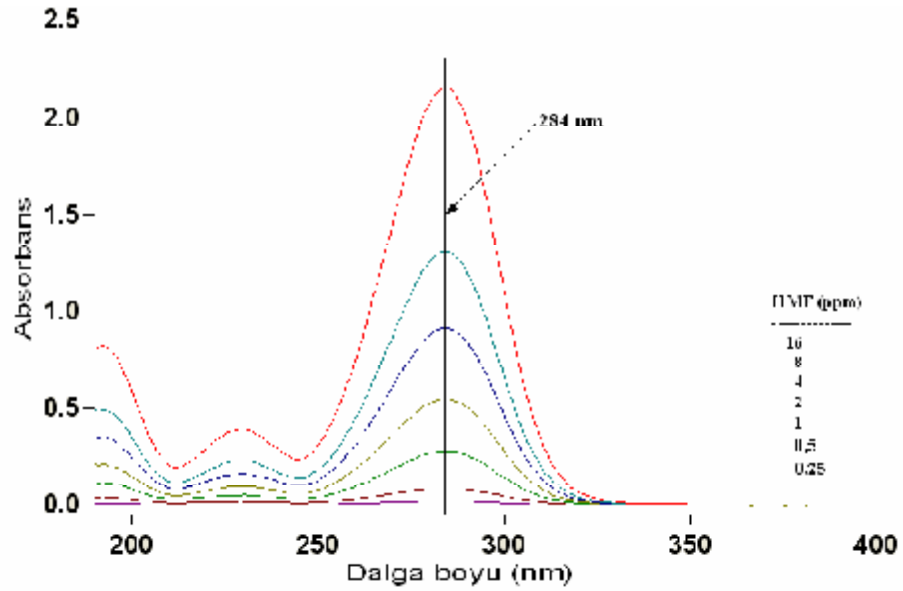
Şekil 3.8. Gliserol ortamında alanin/glukoz sistemin FTIR spektrumları

### 3.2. UV-Vis Spektrofotometresi ile Yapılan Çalışmalar

UV-Vis spektrofotometresi ile yapılan çalışmalarda, Maillard tepkimesi devam ederken aynı anda spektrumlarının kaydedilmesi amaçlanmıştır. Fakat UV-Vis spektrumlarında karışım halinde bulunan maddeler doğrudan spektrum üzerinde analiz edilemeyeceğinden, tepkime karışımında bulunabilecek ürünlerin standart olarak alınması veya tepkime karışımından ayrılıp saflaştırılması ve böylece bu maddelerin tek tek UV-Vis spektrumları belirlenerek en yüksek değerde absorpsiyon yaptığı bölgelerin önceden saptanması gerekmektedir. Maillard tepkimesinin gerçekleşmesi sırasında oluşan ürünlerin birçoğunun ortamdaki ayrılması oldukça zordur. Çok çeşitli kromatografik ayırma tekniklerini ve hatta diyaliz yöntemlerini kullanmayı gerektirir.

Aynı zamanda bu ayrıştırma ve saflaştırma işlemlerinin, denenecek her madde ve koşullar için ayrı ayrı yapılması gerekir. Diğer yandan, bu ürünler genellikle kararlı olmayan ve çok aktif olan maddelerdir. Dolayısıyla çalışma esnasında analiz edilene kadar geçen sürede değişime uğramadan korunması da oldukça zor ve ayrıntılı uygulamalar gerektirmektedir. Bu nedenle de, Maillard tepkimesinin UV-Vis spektrofotometresi ile analizinde, tepkimenin önemli bir ürünü olan ve bilinen bir dalga boyunda maksimum absorbanası olan HMF' nin takibine karar verilmiştir.

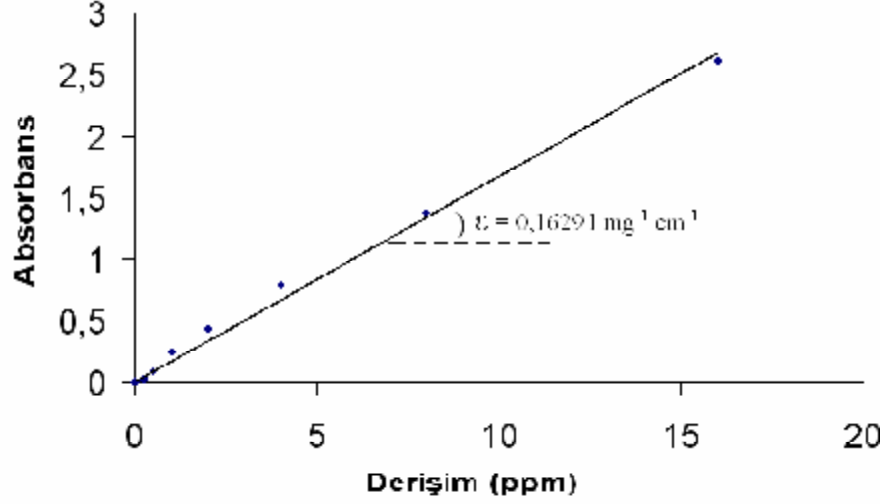
Değişik derişimlerdeki standart HMF' nin 200-400 nm arasındaki spektrumları Şekil 3.8' de verilmiştir. Görüldüğü gibi HMF' nin maksimum absorbanası 284 nm' de gerçekleşmektedir. Bu dalga boyu değeri Maillard tepkimesinin kinetiğinin incelenmesinde HMF' nin derişimindeki değışmenin tepkime boyunca takip edilmesi için kullanılmıştır. Gıdalarda yapılan çalışmalarda da HMF 284 nm' de yaptığı absorbanası ile belirlenmektedir ( Giribet ve Ribas 2000, Akkan vd 2001).



Şekil. 3.9. Çeşitli derişimlerdeki saf HMF' nin UV spektrumu



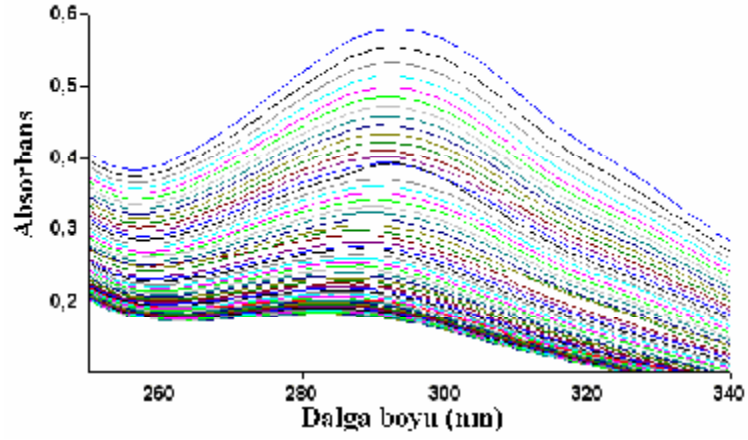
Şekil 3.10 HMF' nin derişimlerini tespit etmek için yapılan kalibrasyon eğrisini göstermektedir.



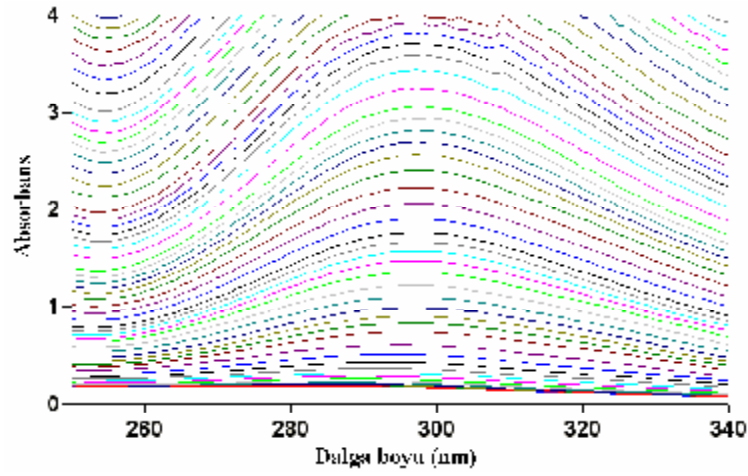
Şekil 3.10. HMF için kalibrasyon eğrisi ( $R^2=0,9935$ )

HMF' nin oluşumunun takibi için hazırlanan tüm model sistemlerin analizi 35, 45 ve 55°C' de gerçekleştirilmiştir. Ancak model sistemlerin hepsinde sıcaklık 35°C olduğu zaman hiçbir HMF oluşumu gözlenmemiştir. Bu nedenle bundan sonraki açıklamalarda sadece 45 ve 55°C' deki inceleme sonuçları verilecektir.

HMF' nin takibi için hazırlanan ilk model lizin/glukoz karışımıdır. Bu karışımın pH 7 ve pH 6 ortamlarında ve 45 ve 55°C' de gireceği Maillard tepkimesinde oluşacak HMF spektrofotometrik yöntemle incelenmiştir. Bu sistemin pH 7 ortamındaki spektrumları Şekil 3.11 ve Şekil 3.12' de verilmiştir.

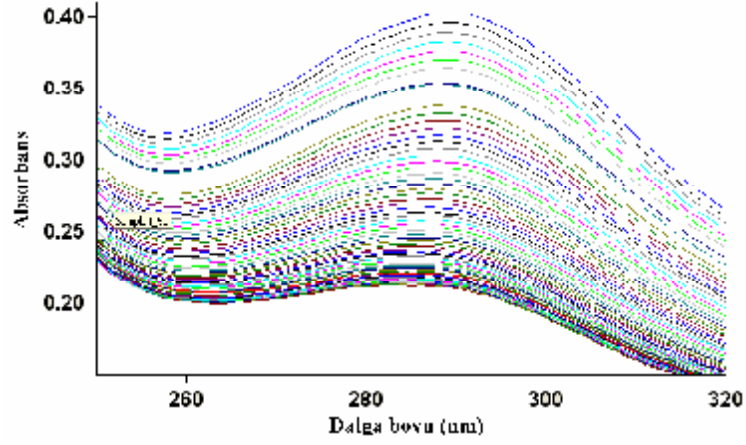


Şekil 3.11. Lysin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

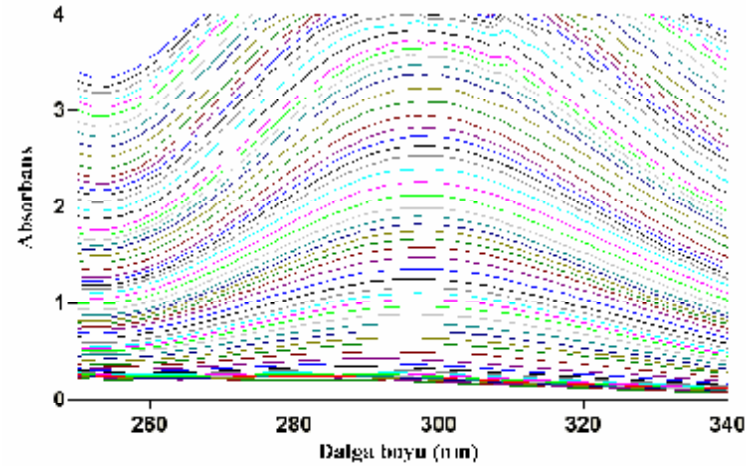


Şekil 3.12. Lysin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

Lisin/glukoz model sisteminin pH 6' daki HMF üretimini 45 ve 55°C' deki sonuçları Şekil 3.13 ve Şekil 3.14' te verilmiştir.

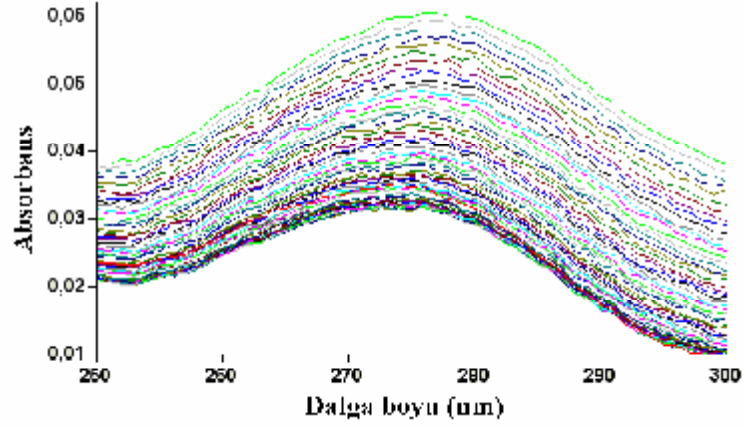


Şekil 3.13. Lisin/glukoz (pH 6) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

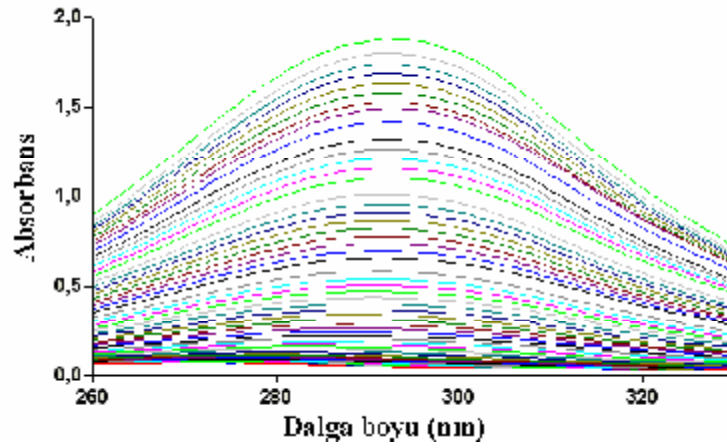


Şekil 3.14. Lisin/glukoz (pH 6) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

Serin/glukoz model sisteminin pH 7' de girdikleri Maillard tepkimesine ait 45 ve 55°C' deki UV-Vis spektrumları Şekil 3.15 ve Şekil 3.16' da sunulmuştur.

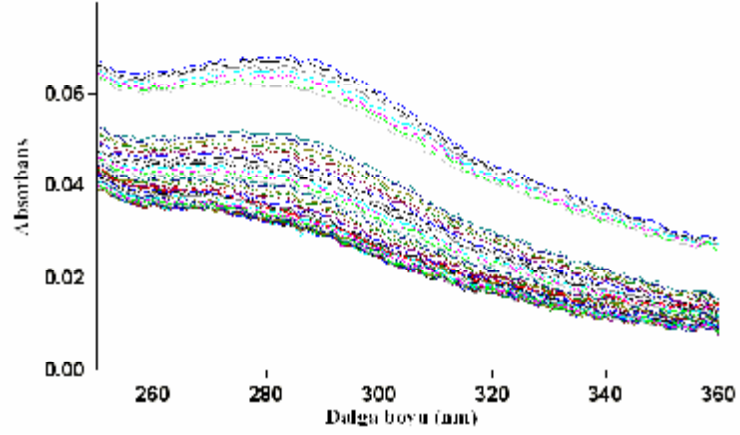


Şekil 3.15. Serin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

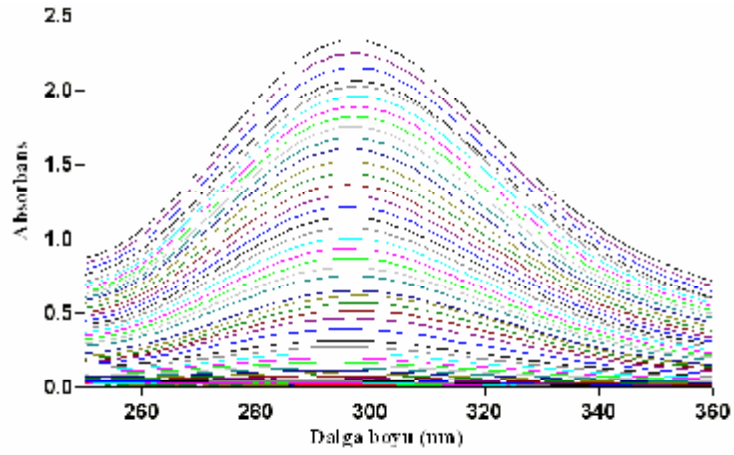


Şekil 3.16. Serin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

Çalışılan diğer bir model sistem glisin/glukoz sistemidir. pH 7 iken 45 ve 55°C’ de alınan UV-Vis spektrumları Şekil 3.17 ve Şekil 3.18’ de görülmektedir.

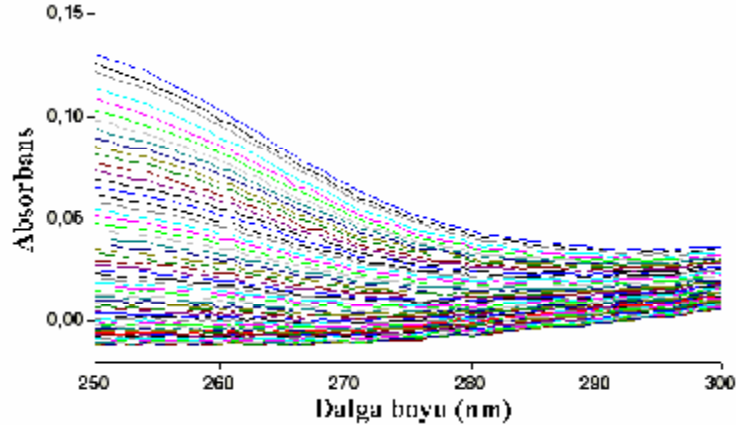


Şekil 3.17. Glisin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C’ de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

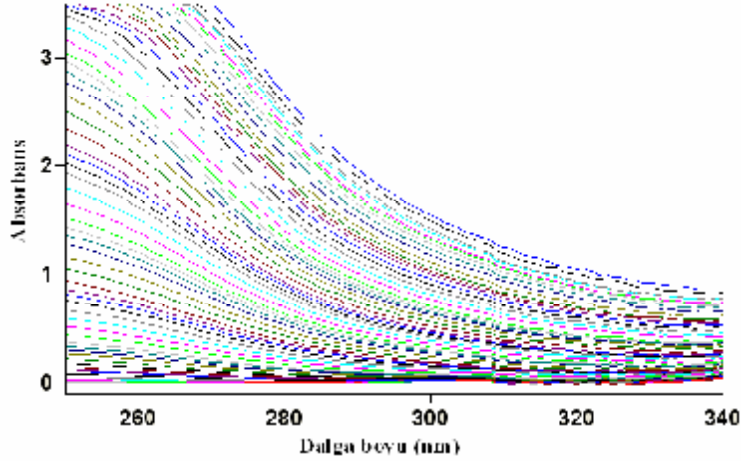


Şekil 3.18. Glisin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C’ de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

Bu bölümde çalışılan son model sistem alanin/glukoz karışımıdır. pH 7' de sabit tutulmuştur. Bu model sisteme ait 45 ve 55°C' deki UV-Vis spektrumları Şekil 3.19 ve Şekil 3.20' de verilmiştir.



Şekil 3.19. Alanin/glukoz (pH 7) sisteminin 45°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları



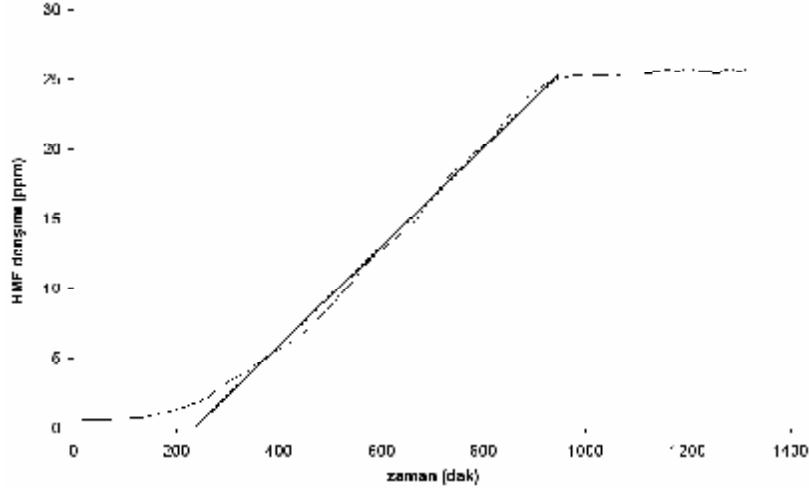
Şekil 3.20. Alanin/glukoz (pH 7) sisteminin 55°C' de 22 saatlik ısıtma süresi boyunca 20 dakikada bir kaydedilen spektrumları

Bu bölümde kullanılan model sistemlerden lyslys/glukoz, lyslysls/glukoz, aspartik asit/glukoz ve aspartil aspartik asit/glukoz model sistemlerinin her biri pH 7' de sabit tutulmuş ve 35, 45 ve 55°C' deki 22' şer saatlik tepkime boyunca UV-Vis spektrumları alınmıştır. Ancak hiç birinde kayda değer bir HMF oluşumu gözlenmemiştir.

Şekil 3.11' den Şekil 3.20' ye kadar olan tüm spektrumlarda HMF' nin maksimum absorbans yaptığı 284 nm dalga boyunda tepkime süresi arttıkça absorbansta da devamlı bir artış gözlenmektedir. Bu artış her model sistemde Maillard tepkimesinin artan süresiyle birlikte HMF' nin derişiminin de arttığı lehinde yorumlanmıştır.

UV-Vis spektrumlarının Maillard tepkimesinin kinetiği hakkında bilgi edinilmesinde kullanılabilmesi için absorbans-zaman verilerinin derişim-zaman verilerine dönüştürülmesi gerekir. Bu işlem HMF' nin kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $k$  değerinin HMF derişimlerinin hesaplanmasında kullanılmasıyla yapılmıştır. Tüm model sistemlerde HMF oluşumuna ilişkin elde edilen derişim-zaman verileri çizelge halinde Ek 1' de sunulmuştur. Bu çizelgelerdeki derişim-zaman verileri grafik şekline dönüştürüldüğünde grafiklerin çoğunda derişim ile zaman arasındaki ilişkinin doğrusal olarak yorumlanabileceği kabul edilmiştir. Bu grafiklere bir örnek lizin/glukoz sistemine ait pH 7 ve 55°C' deki derişim-zaman grafiğidir (Şekil 3.21). Bu grafiklerde , HMF oluşumunun tepkimenin başlangıç sürelerinde kayda değer miktarda gerçekleşmediği ve doğrusal artışın sıcaklıkla azalan bir süre sonunda belirgin hale geldiği görülmektedir. Örneğin Şekil 3.21' de HMF üretiminin henüz hız kazanmadığı bu süre, yaklaşık 230 dakikadır. Derişim-zaman verileri arasındaki doğrusal ilişki, tepkimenin kinetiğinin çalışılan ortam koşullarında sıfır derece olduğunu göstermektedir. Böylece derişim-zaman grafiklerinde çizilen doğruların eğimleri Maillard tepkimesinde HMF oluşumunun kinetiğine ilişkin sıfıncı dereceden hız sabitlerini vermiştir. Çizelge 3.1 de çalışılan model sistemlerde ilgili pH ve sıcaklık koşullarında Maillard tepkimesi sırasında HMF oluşumuna ilişkin hız sabitleri sunulmuştur. Çizelge 3.1 incelendiğinde, çalışılan her bir model sistemde sıcaklık arttıkça kararma tepkimesi için önerilen hız sabitinin değerinin de arttığı görülmektedir. pH 7 iken, hız sabitlerinin değerleri karşılaştırıldığında Maillard tepkimesinde her iki

sıcaklıkta lisinin serin, alanin ve glisinden daha aktif olduğu, serin, alanin ve glisinin ise yaklaşık eşdeğer aktiflikte görüldükleri söylenebilir.



Şekil 3.21. Lisin/glukoz sistemine ait pH 7' de ve 55°C' deki HMF oluşumu

Çizelge 3.1. UV-Vis verilerinin derişim-zaman eğrilerinden hesaplanan HMF oluşum hız sabitleri

Model tepkime	k (mg l <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Lisin /Glukoz (45°C, pH 6)	0,0016	0,9943
Lisin /Glukoz (55°C, pH 6)	0,0297	0,9954
Lisin/Glukoz (45°C, pH 7)	0,0027	0,9861
Lisin/Glukoz (55°C, pH 7)	0,0344	0,9930
Serin/Glukoz (45°C, pH 7)	0,0003	0,9814
Serin/Glukoz (55°C, pH 7)	0,0178	0,9967
Alanin/Glukoz (45°C, pH 7)	0,0003	0,9967
Alanin/Glukoz (55°C, pH 7)	0,0183	0,9974
Glisin/Glukoz (45°C, pH 7)	0,0003	0,9939
Glisin/Glukoz (55°C, pH 7)	0,0190	0,9990

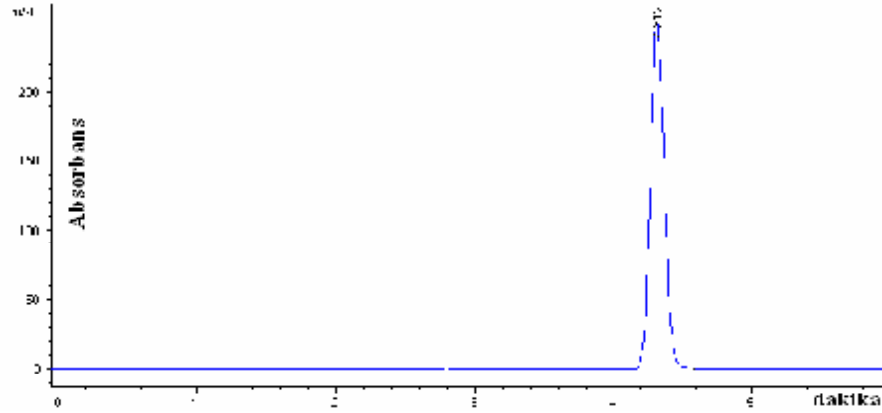
Bölüm 1.2' de bahsedilen Ashoor ve Zent'in (1984) sıralamasında glisin, lisin gibi aktif amino asitlerin arasında bulunmaktadır. Alanin orta düzeyde aktiflik gösteren amino asitler arasındadır ve serin ise bu sıralamalarda yer almamaktadır. Serin'in alaninden daha düşük bir aktifliğe sahip olduğu laboratuvarlarımızda önceden



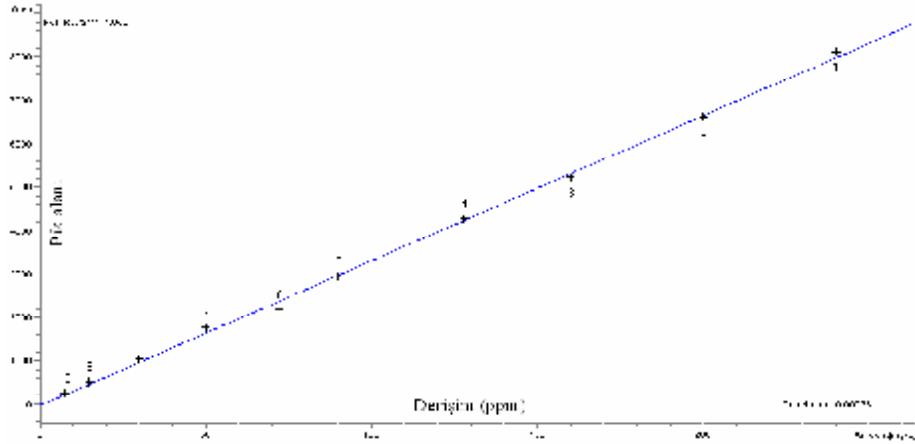
gözlemlenmişti (Akpınar, 2000). Yukarıdaki her iki çalışmada Maillard tepkimesi kararma miktarının takibi ile incelenmişti. Ancak bu çalışmada elde edilen sıralama, HMF' nin takibiyle yapılmıştır. Kararma miktarının takibi ve HMF' nin takibine göre yapılan değerlendirmede incelenen başlangıç maddelerinin aktiflik sırasının farklı bulunması aynı tepkime koşullarındaki sistemlerde tekrar incelenmelidir. Çünkü literatürde yer alan bir çok çalışmada tepkime koşulları da farklılık göstermektedir.

### 3.3. HPLC ile Yapılan Çalışmalar

Maillard tepkimesinin kinetiğinin HPLC ile takibinde kullanılan model sistemler glisin/glukoz, glygly/glukoz, glyglygly/glukoz ve glyglyglygly/glukoz karışımlarıdır. pH, tüm sistemlerde fosfat tamponuyla 5.5' ta sabit tutulmuştur. Tepkimenin gelişiminin takibi; tepkime üretilen HMF' nin derişimi ve kararmanın miktarı izlenerek yapılmıştır. Çalışılan tepkime sıcaklıkları 70, 80, 90, 100 ve 110°C' dir. Saf HMF' nin metot bölümünde açıklanan koşullardaki bir kromatogramı Şekil 3.22' de verilmiştir. Görüldüğü üzere analiz koşullarında HMF'nin alıkonma süresi 4,3 dakikadır. HMF için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.23' te görülmektedir.

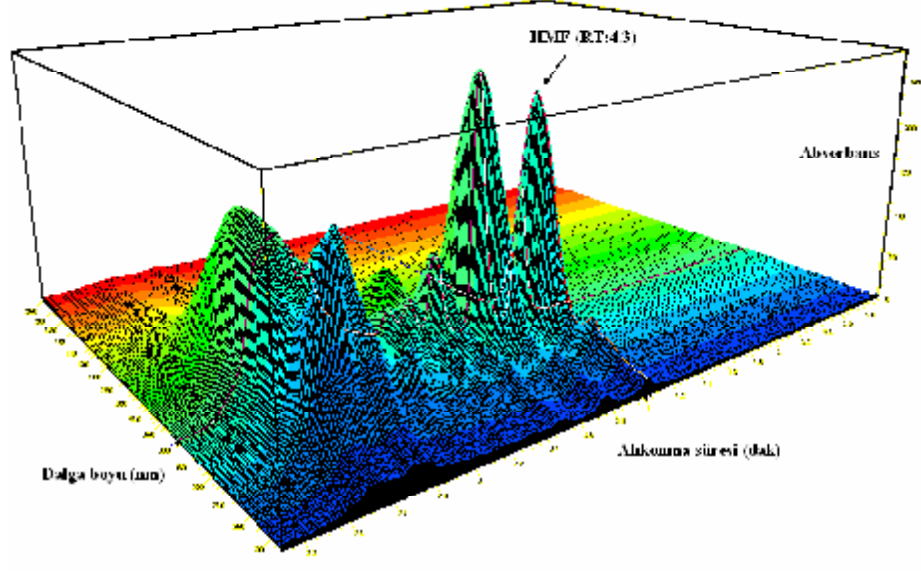


Şekil 3.22. Standart HMF' ye ait kromatogram (50 ppm)

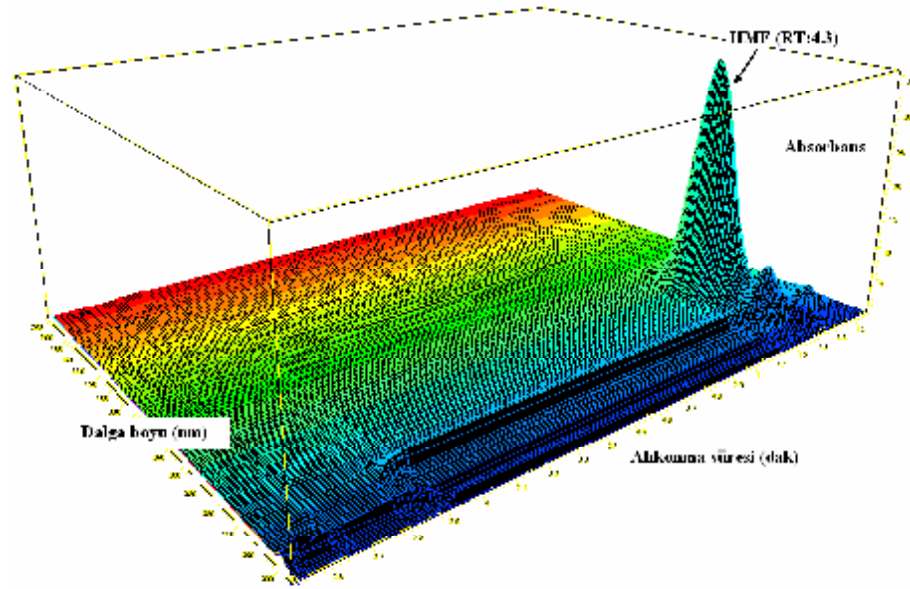


Şekil 3.23. HMF için kalibrasyon eğrisi

Glisin ve peptitleriyle yapılan ölçümlerde, metot bölümünde açıklanmış olan kromatografi koşullarının, tepkime ortamında HMF'nin kantitatif olarak saptanmasında çok uygun olduğu görülmüştür. Tüm örneklerde, HMF, 4,3. dakikada ve 284 nm'deki sinyaller dikkate alınarak değerlendirilebildiği halde, aynı zamanda HPLC' de otomatik olarak 190 – 520 nm arasında taranarak, çözeltilerin spektro-kromatogramları da kaydedilmiştir. Şekil 3.24 ve Şekil 3.25' te sırasıyla bir tepkime karışımına ve saf HMF' ye ait spektro-kromatogramlar verilmiştir. Bu kayıtlar tespit edilen HMF piklerinin standart madde ile karşılaştırılmasında ve pik saflığının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Spektro-kromatogramlarda HMF' ye ait absorbansa karşı dalga boyu ve absorbansa karşı alıkonma süresi bilgileri bir arada bulunmaktadır. Dolayısıyla standart maddeye ait pik bu parametrelerle tanımlanıp kaydedilmekte ve tepkime karışımından elde edilen piki veren maddenin saflığı da kolaylıkla test edilebilmektedir.



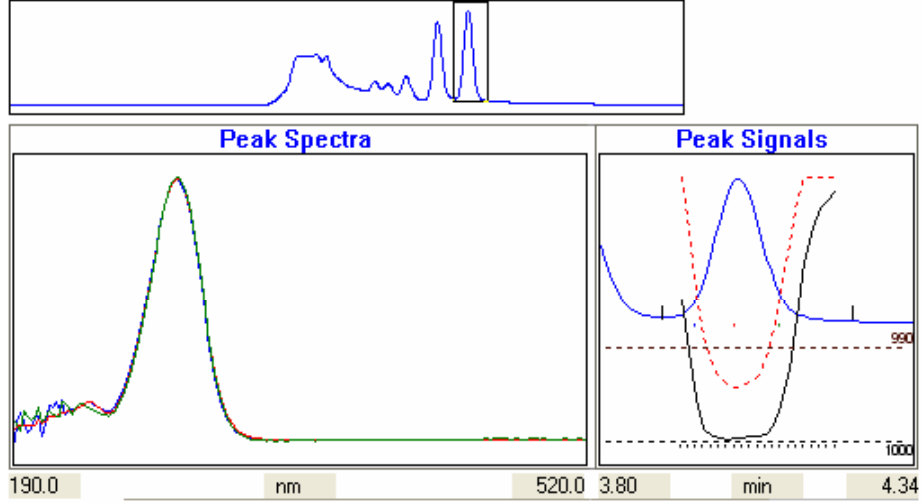
Şekil 3.24. Glyglygly' nin glukoz ile tepkimesinden (pH 5.5, 110°C), 4 saat sonra alınan numuneye ait spektro-kromatogram



Şekil 3.25. Standart HMF' nin (7,5 ppm) spektro-kromatogramı

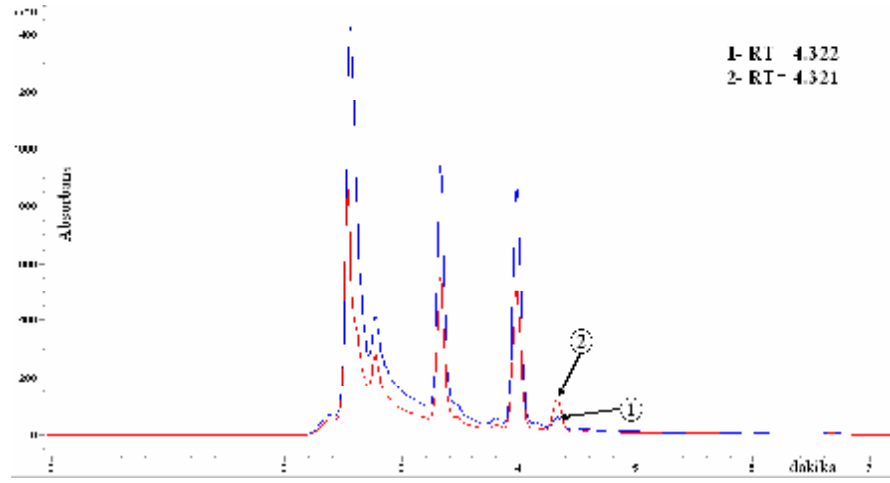
Pik saflığının kontrolü tüm örnekler için uygulanmıştır. Bu testin gerektirdiği sayısal yöntem Chemstation yazılımında mevcuttur. Örneklerin çok büyük bir kısmı için pik

saflığı faktörünün, standarttan belirlenen değer aralığı içinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.26).

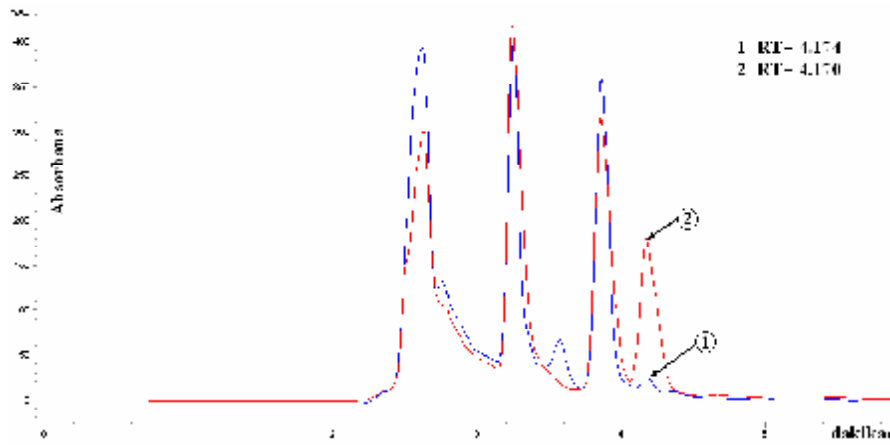


Şekil 3.26. Glygly' nin glukoz ile tepkimesinden (pH 5.5, 110°C), 3 saat sonra alınan numunedeki HMF' ye ait pikin, standart HMF' nin dalga boyu aralığıyla ve sinyalin konumuyla karşılaştırıldığını gösteren grafikler

Deneylerin bazı tekrarlarına ait ölçümlerde, ender olarak bazı piklerin pik saflığı faktörü standart maddenin sınır değerleri dışında bulunmuştur. Bunun nedeninin analiz esnasında kolon basıncının olağan değerinden daha yüksek olup alıkonma süresinin 0,2 - 0,4 dakika kadar saptığı ve sinyallerin standart olarak belirlenen aralığa yerleşmemesi olduğu anlaşılmıştır. Bu piklerin absorpsiyon yaptığı dalga boyu aralığında herhangi bir önemli değişim ve pik alanında genel seyre uymayan bir değer görülmediğinden, söz konusu tepkime karışımına standart HMF eklenerek yeniden enjeksiyon yapılmış ve pik saflığı bu yolla test edilmiştir. Kromatogramdaki konumu itibariyle az da olsa şüpheli görülen bu tür pikler için böylece bu yolla kesin bir tespit yapılabilmiştir. Şekil 3.27 ve Şekil 3.28 pik saflığının tekrar test edildiği deneylerden iki örneği göstermektedir. Piklerin standart eklendikten sonra aynı konumda yalnızca yüksekliğinin arttığı görülmektedir.



Şekil 3.27. Tepkime karışımındaki HMF' ye ait pik (1) ile aynı karışıma standart HMF eklendikten sonra elde edilen piklerin (2) karşılaştırılması (Glygly, 80°C)

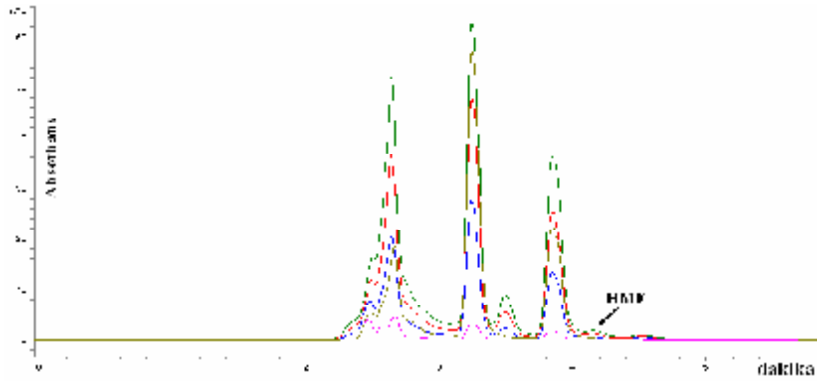


Şekil 3.28. Tepkime karışımındaki HMF' ye ait pik (1) ile aynı karışıma standart HMF eklendikten sonra elde edilen piklerin (2) karşılaştırılması (Glyglygly, 80°C)

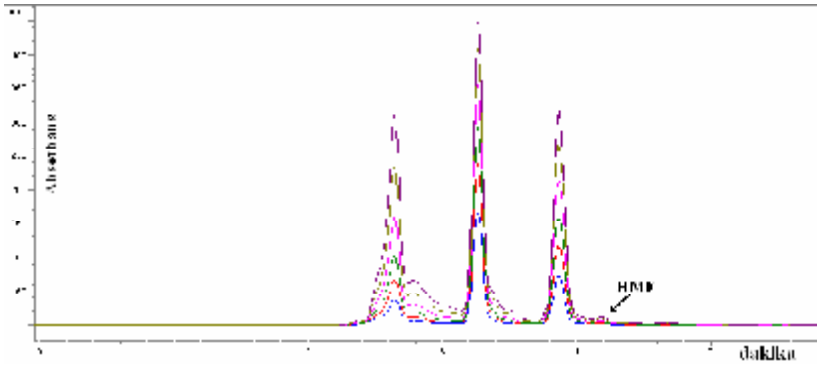
Glisin, glygly ve glyglygly ile yapılan 70°C' deki deneylerde HMF oluşumu hiçbirinde 120 dakikadan önce görülmemiştir. Bu model sistemlerde tepkime süresi boyunca HMF' nin oluşmasını göstermek amacıyla Şekil 3.29, Şekil 3.30 ve Şekil 3.31' de sırasıyla gly/glukoz, glygly/glukoz ve glyglygly/glukoz sistemlerinin 70°C' de alınmış HPLC kromatogramları sunulmuştur. Söz konusu kromatogramlar

incelendiğinde, her bir model sistem için tepkime süresi ve sıcaklık arttıkça HMF' nin derişiminin de arttığı görülmektedir. Diğer sistemlere ait bazı örnek kromatogramlar Ek 2' de verilmiştir.

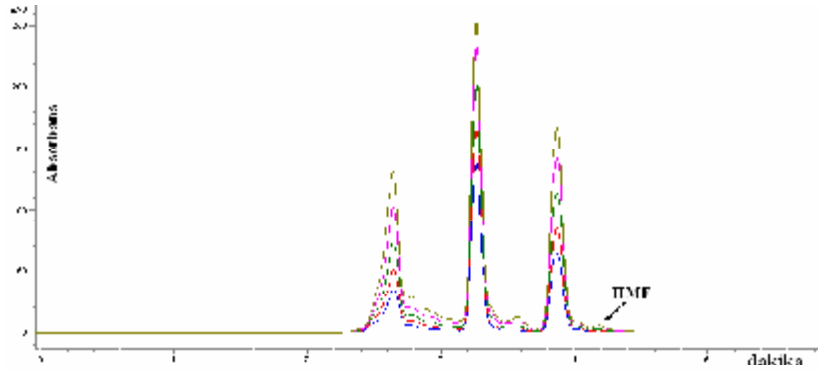
Glyglyglygly' nin sudaki çözünürlüğü oda sıcaklığında çok düşüktür. 70°C' de önemli bir kısmı çözünmekte fakat 0,5M'lık derişime ulaşacak kadar çözünmesi ancak 80°C' de gerçekleşmektedir. Bu nedenle 70°C' de denemeye alınmamıştır.



Şekil 3.29. Glisin/glukoz sisteminde 70°C' deki HMF oluşumu

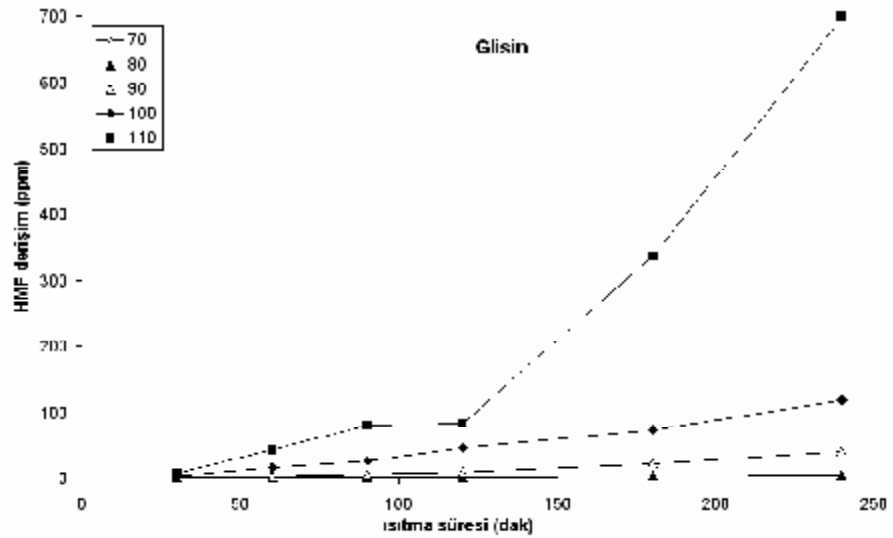


Şekil 3.30. Glygly/glukoz sisteminde 70°C' deki HMF oluşumu

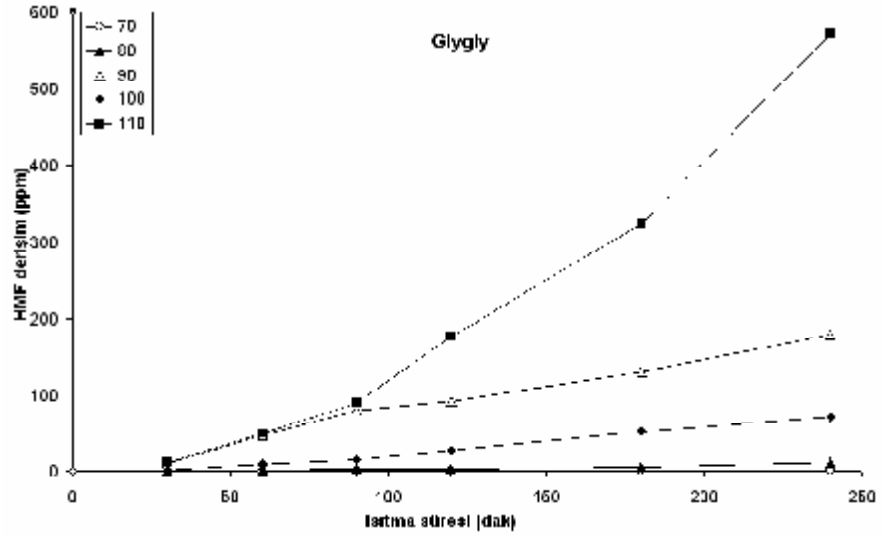


Şekil 3.31. Glyglyly/glukoz sisteminde 70°C’ deki HMF oluşumu

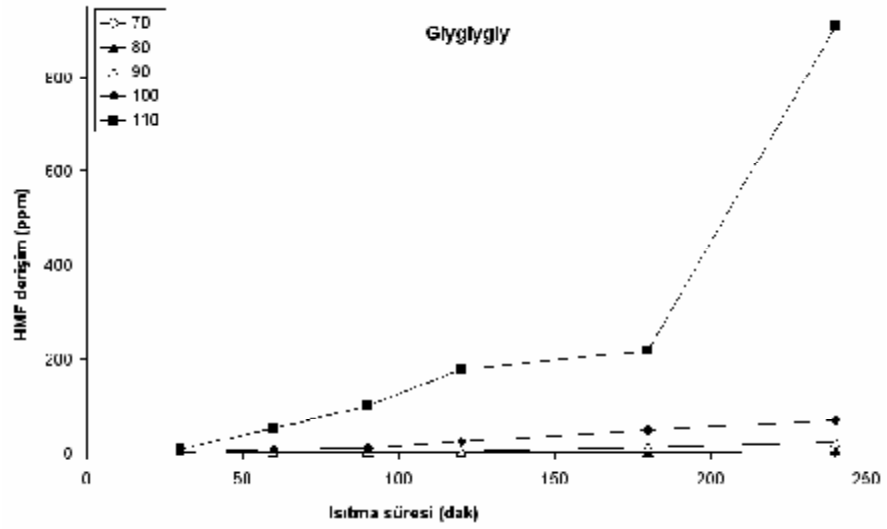
Tüm model sistemlerde HMF için HPLC kromatogramlarından elde edilen pik alanları Ek 3’ te verilmiştir. HMF için elde edilen kalibrasyon eğrisinin kullanılmasıyla (Şekil 3.23) her bir model sistem için 70, 80, 90, 100 ve 110°C’ deki HMF pik alanları HMF derişimlerine dönüştürülmüştür. Bu veriler her bir model sistem ve sıcaklık için HMF için derişim-ısıtma süresi grafiklerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Şekil 3.32, Şekil 3.33, Şekil 3.34 ve Şekil 3.35’ te glukozun sırasıyla glisin, glygly, glyglygly, glyglyglygly ile girdiği Maillard tepkimesinde üretilen HMF derişim-zaman grafikleri sunulmuştur.



Şekil 3.32. Glisin/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi

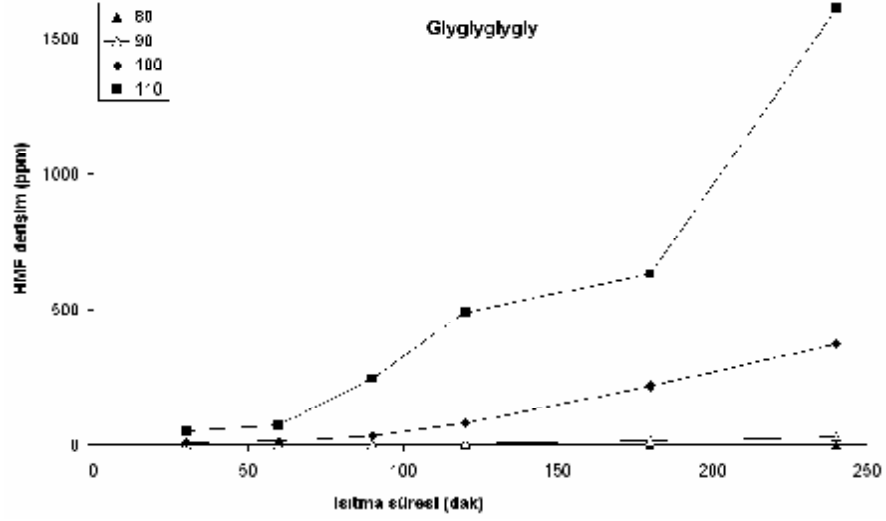


Şekil 3.33. Glygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi



Şekil 3.34. Glyglygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi



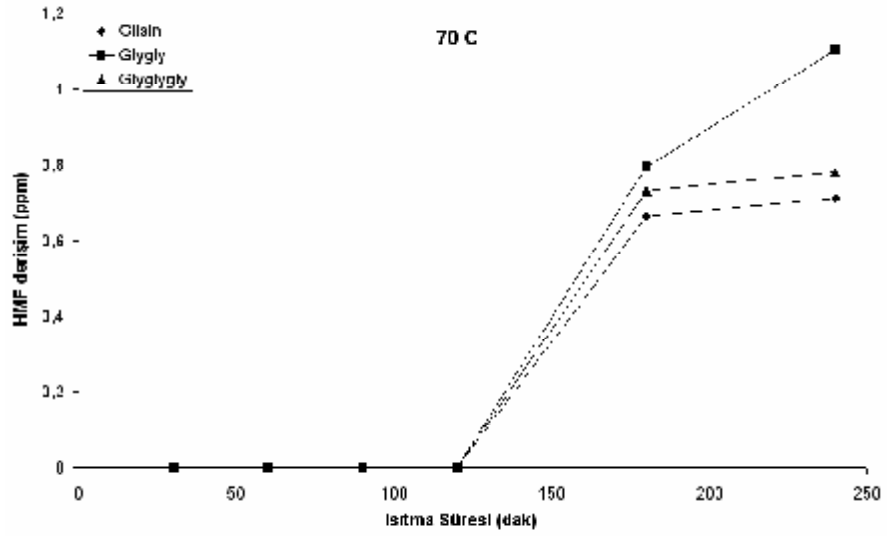


Şekil 3.35. Glyglyglygly/glukoz sisteminde farklı sıcaklıklardaki HMF üretimi

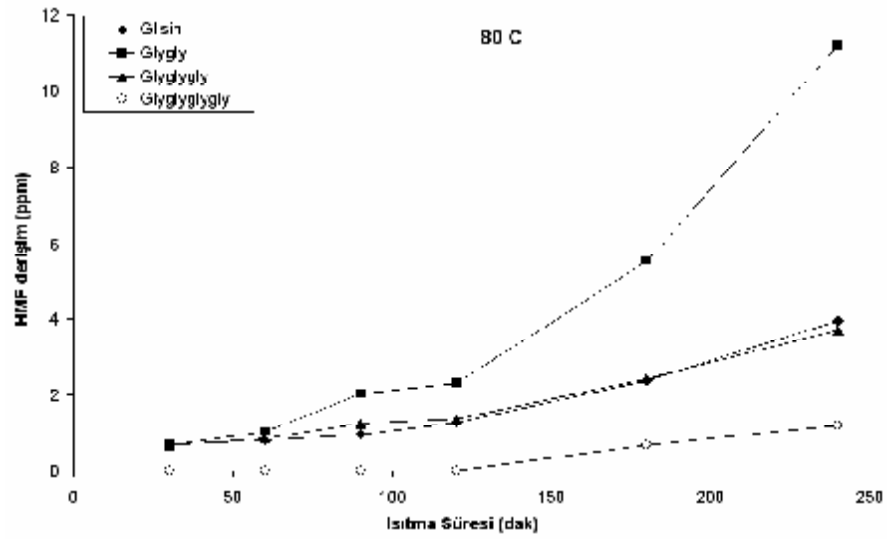
Grafiklerden anlaşılacağı gibi sıcaklık arttıkça, sadece Şekil 3.33’ deki 90 ve 100°C verileri dışında, her bir model sistemde üretilen HMF’ nin miktarı da artmaktadır.

Glisin, glygly, glyglygly ve glyglyglygly’ nin HMF üretimindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla her bir sıcaklıkta, farklı sistemlerde üretilen HMF’ nin derişim-ısıtma süresi grafikleri de hazırlanmış ve Şekil 3.36, Şekil 3.37, Şekil 3.38, Şekil 3.39 ve Şekil 3.40’ da sunulmuştur.

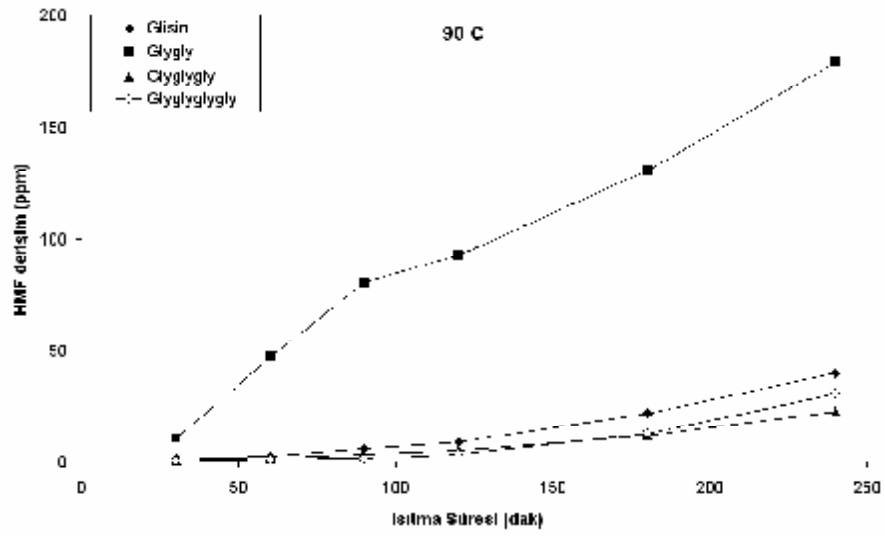
70°C’lik tepkime ortamında glygly’ nin HMF üretiminde en aktif olduğu, bunu sırasıyla glyglygly ve glisinin takip ettiği anlaşılmaktadır. Bu sıcaklıkta yaklaşık 120 dakikaya kadar kayda değer bir HMF üretimi olmamaktadır (Şekil 3.36). 80°C’ de HMF üretiminde en etkili bileşiğin yine glygly olduğu, glisin ve glygly’ nin tepkime süresi boyunca birbirine yakın ama glygly’e göre daha az etkili olduğu ve glyglyglygly’ nin ise en az etkili bileşik olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.37). Bu sıcaklıkta glyglyglygly tepkimesinin yaklaşık 120. dakikasına kadar kayda değer miktarda HMF üretimi verememiştir. Belirgin miktarda HMF’ nin oluşmadığı bu süre glisin, glygly ve glyglygly sistemleri için 30 dakika civarına inmiştir. 90°C’ de glygly’ nin Maillard tepkimesinin HMF üretimindeki rolünün diğerlerinden çok daha fazla önem kazandığı



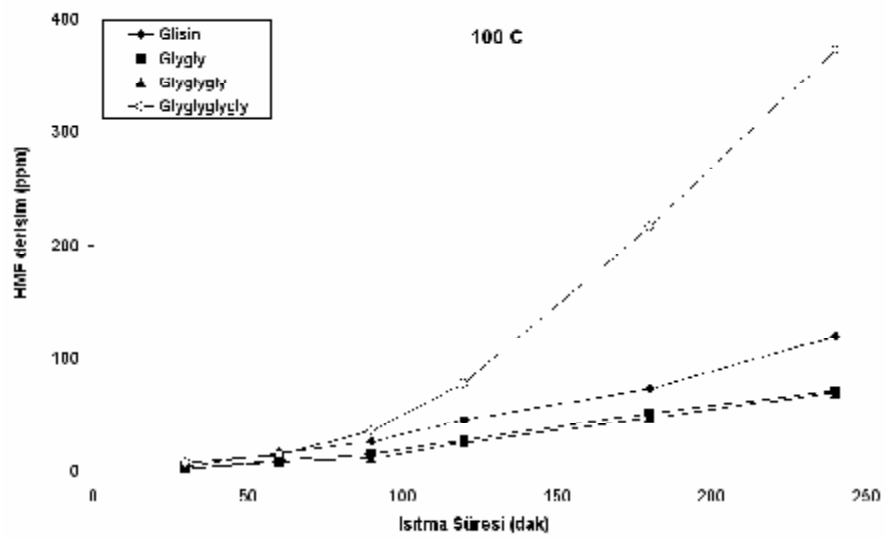
Şekil 3.36. 70°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri



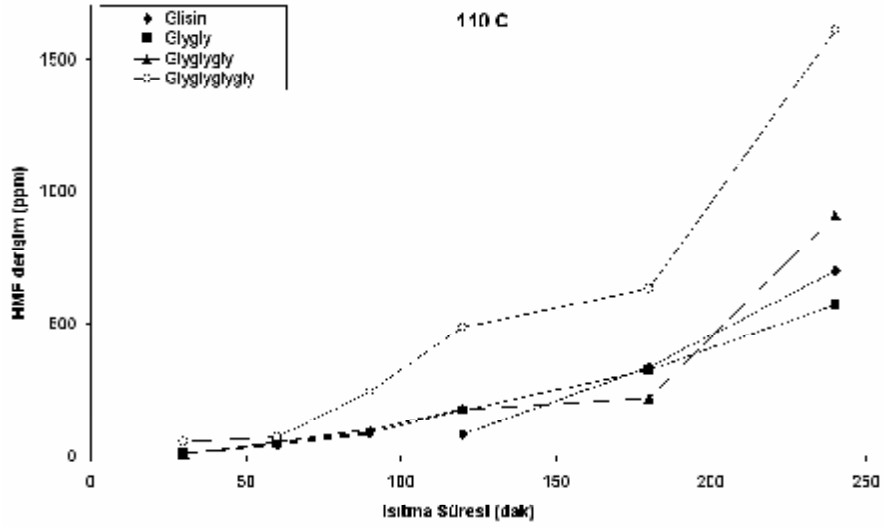
Şekil 3.37. 80°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri



Şekil 3.38. 90°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri



Şekil 3.39. 100°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri



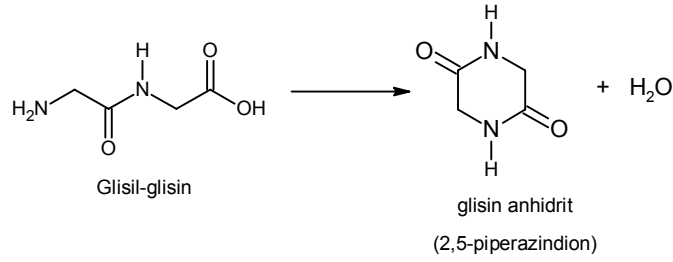
Şekil 3.40. 110°C’deki her bir model sistem için HMF’ nin derişim-zaman grafikleri

Şekil 3.38’ de gözlenmektedir. Ayrıca bu sıcaklıkta tepkime süresince glisin sisteminde glyglygly ve glyglyglygly sistemlerine göre daha fazla HMF oluşmuştur. Şekil 3,39 ve Şekil 3.40’ da sıcaklığın 100 ve 110°C’ ye çıkarılmasıyla glyglyglygly içeren model sistemin HMF üretiminde diğerlerine göre çok daha aktif etki gösterdiği açıkça belli olmaktadır. Önemli bir HMF miktarının gözlenmediği tepkime süresi bu sıcaklıklarda yine 30 dakika civarındadır.

Böylece çalışılan koşullarda sıcaklık arttıkça glisin ve peptitlerinin aktiflik sırasının değiştiği anlaşılmaktadır. Normalde her bir sıcaklıkta peptitlerin içerdiği amino asit sayısının artmasıyla molekül ağırlığındaki ve hacimdeki artış nedeniyle oluşturdukları HMF miktarının da azalması beklenebilirdi. Çünkü her bir bileşikte bir tane serbest amin grubu bulunmaktadır. Fakat farklı sıcaklıklardaki derişim-zaman grafikleri (Şekil 3.36-Şekil 3.40), 70, 80 ve 90°C’ de glygly’ nin, 100 ve 110°C’ de de glyglyglygly’ nin çok daha fazla HMF ürettiklerini ortaya koymuştur. 80°C’ de de glisin ve glyglygly’ nin yaklaşık aynı aktifliğe sahip olmaları ilginçtir. 90°C’de glygly dışındaki maddelerin aktifliklerinin birbirine yakın görünmesi, HMF derişim ölçeğinin, glygly verilerinin grafiğe dahil edilebilmesi amacıyla büyük alınması nedeniyle olabilir. Aynı durum 100 ve 110 °C’ de glyglyglygly dışındaki sistemlerden elde edilen veriler

için de geçerlidir. Aradaki farkların önemli olup olmadığı istatistik testin sonucunda tartışılmıştır.

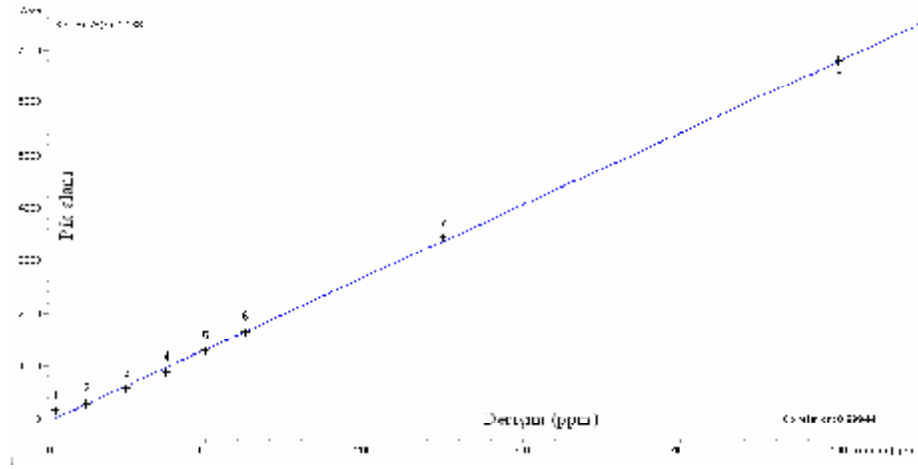
Glygly'nin HMF oluşturmasında 70, 80, 90°C ile 100 ve 110°C koşullarında birbirine tam zıt davranışlar sergilemesi üzerine, sıcaklık 90°C' den daha yüksek olduğunda, glygly' nin altı üyeli halkalı yapı glisin anhidrite dönüşmüş olabileceği düşünülmüştür. Bu dönüşüm aşağıda gösterilmiştir.



Bu durumun gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılabilmesi için önce glisin anhidrit için Şekil 3.41' de gösterilen kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, daha sonra aşağıda belirtilen deneyler yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

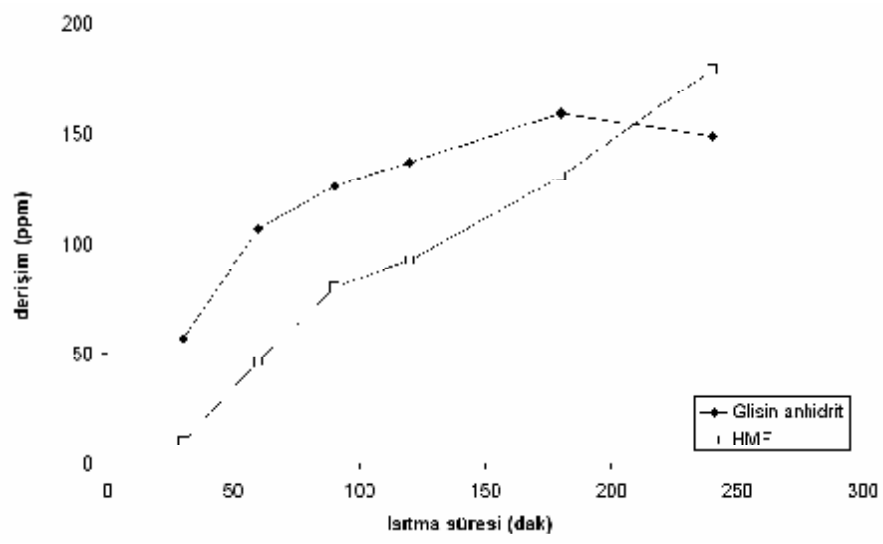
- 0,5M Glygly/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 90°C' de glisin anhidrit tayini
- 0,5M Glygly/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 100°C' de glisin anhidrit tayini
- 0,5M Glygly/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 110°C' de glisin anhidrit tayini
- 0,5M Glisin anhidrit/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 90°C' de HMF tayini
- 0,5M Glisin anhidrit/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 100°C' de HMF tayini
- 0,5M Glisin anhidrit/0,5MGlukoz (1/3, pH:5,5) sisteminde 110°C' de HMF tayini

Örneklerdeki glisin anhidrit C18 (4.0 x 25 mm, 5µm) kolonunda, fosfat tamponu ile (0,45M, pH 2.1), 1,5 ml/dak akış hızında isokratik olarak 200 ve 254 nm' deki sinyaller kaydedilerek analiz edilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C ve kolon basıncı 170 bardır.

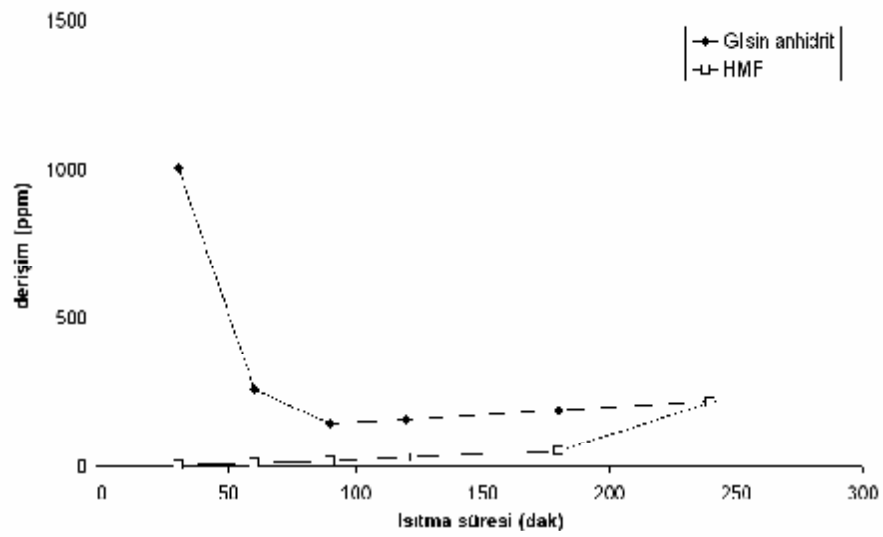


Şekil 3.41. Glisin anhidrit için kalibrasyon eğrisi

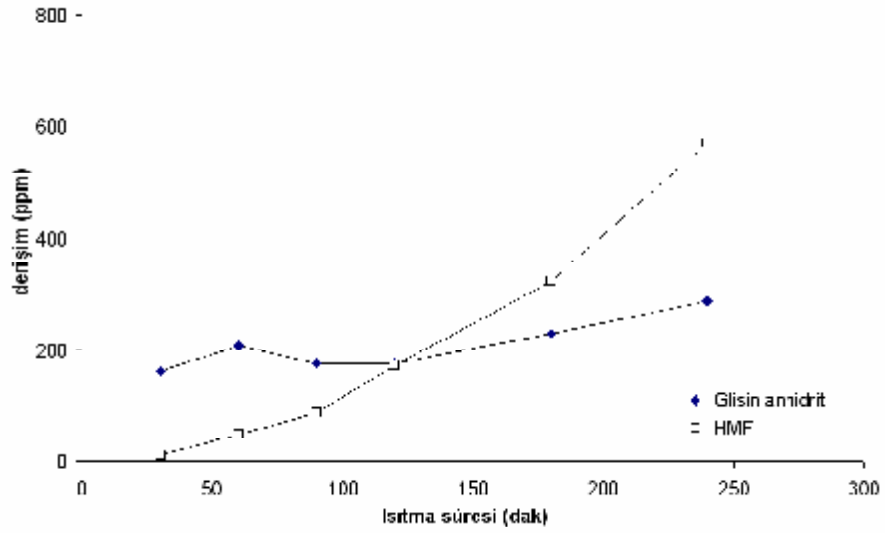
Şekil 3.42' de glygly' nin 90°C' deki tepkimesinde oluşan glisin anhidrit derişimleri, aynı sistemde daha önceki çalışmalarda saptanmış olan HMF derişimleriyle birlikte verilmiştir. Görüldüğü üzere her ikisinin artışı da paralel gitmektedir. Glisin anhidrit oluşumunun HMF oluşumuna herhangi bir etkisi olduğundan bahsedilememektedir. Glisin anhidritin örneğin 180 dakika sonra 160 ppm civarına ulaştığı tespit edilmektedir. Şekil 3.43' de verilen 100°C' deki çalışmanın sonuçlarında ise, ilk 30 dakikada glisin anhidritin 1000 ppm civarına ulaştığı 90 dakikaya kadar hızla 150 ppm civarına indiği ve sonrasında da hemen hemen bu miktarlarda seyrettiği görülmektedir. Glisin anhidritin en yüksek miktarlardan düşük seviyelere inmesi sırasında da HMF' nin minimum miktarlarda oluştuğu ve daha sonra çok yavaş bir şekilde derişiminin arttığı gözlenmektedir. Şekil 3.44' de glygly/glukoz sisteminde 110°C' de tayin edilen glisin anhidrit derişimleri ile yine aynı sistemle daha önceden elde edilmiş olan HMF derişim verileri sunulmuştur. Bu grafikte, glisin anhidritin Şekil 3.43' de görülen yaklaşık 1000 ppm lik derişimden 15 ppm ye düşmesi olayının daha hızlı gerçekleştiği ve yaklaşık 30 dakika içinde düşük derişimlere ulaştığı görülmektedir.



Şekil 3.42. 90°C’ de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı

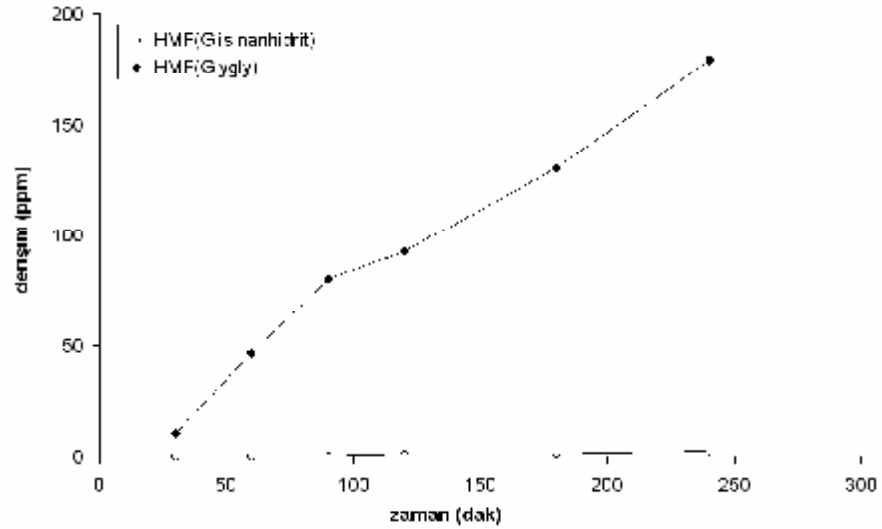


Şekil 3.43. 100°C’ de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı



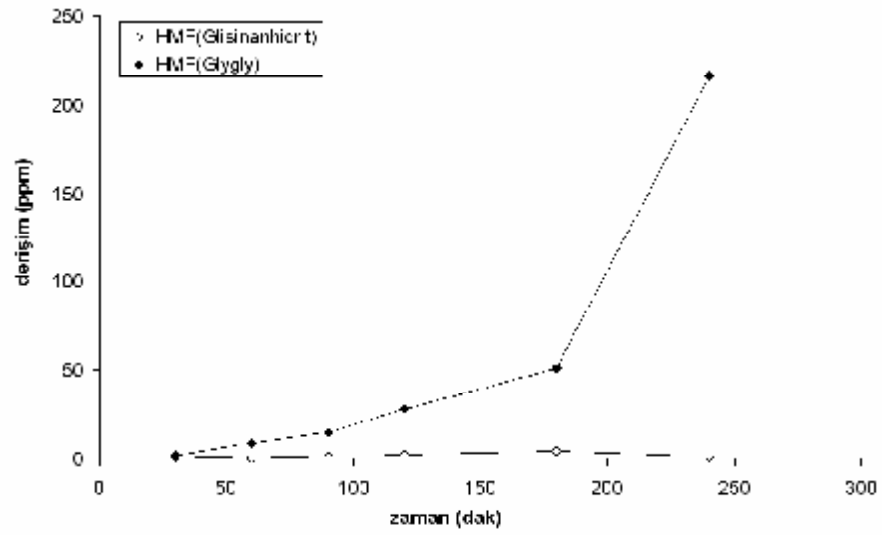
Şekil 3.44. 110°C' de glygly/glukoz sisteminde glisin anhidrit miktarı

Şekil 3.45, Şekil 3.46 ve Şekil 3.47' de glisin anhidritin ve glygly' nin glukozla verdiği tepkimede sırasıyla 90, 100 ve 110 °C' de ürettikleri HMF miktarları görülmektedir. Tüm sıcaklıklarda glisin anhidritin ürettiği miktarların, glygly' nin ürettiği miktarlara oranla çok düşük kaldığı görülmektedir.

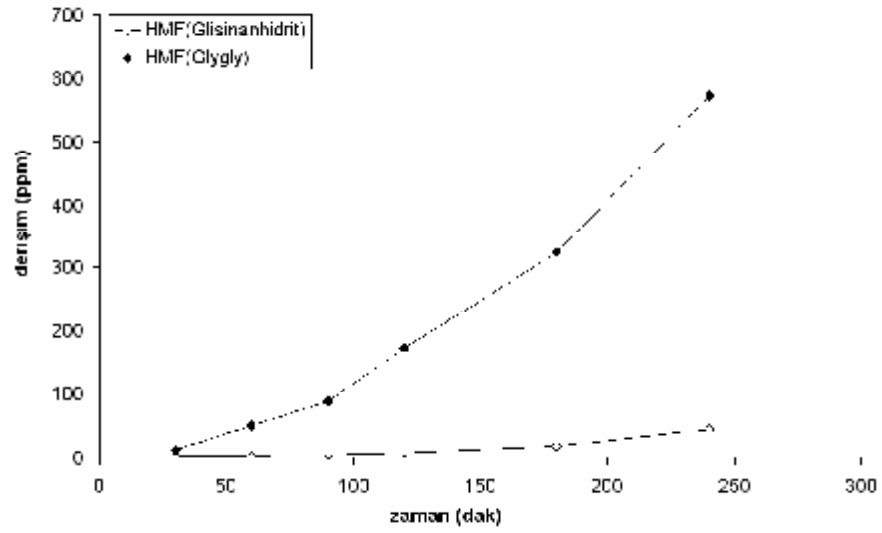


Şekil 3.45. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 90°C' deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri





Şekil 3.46. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 100°C’ deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri



Şekil 3.47. Glygly/glukoz sistemi ile glisin anhidrit/glukoz sisteminin 110°C’ deki tepkimelerinde HMF oluşumuna ait derişim-zaman grafikleri

Aslında sonuç olarak, incelenen 90, 100 ve 110°C koşullarında glisin anhidrit varlığının HMF üretimine yol açmadığı söylenebilir. Şekil 3.42, Şekil 3.43 ve Şekil 3.44' teki glisin anhidrit miktarları incelendiğinde ise, bunların olabilecek deneysel hatalar içinde yaklaşık sabit değerlerde olduğu görülmektedir. Yani glygly içeren model sistemlerin hepsinde yaklaşık aynı düşük miktarda glisin anhidrit bulunmaktadır. Bu gözlem glygly' nin 100 ve 110°C' de HMF üretimindeki aktivitesinin azalmasının, bu sıcaklıklarda glygly' nin glisin anhidrite dönüşmesi varsayımıyla açıklanamayacağını anlatmaktadır.

Şekil 3.32, Şekil 3.33, Şekil 3.34 ve Şekil 3.35' te gösterilen HMF' nin derişim-zaman grafiklerindeki tüm noktalar incelendiğinde üstel artış gösteren bir eğri şeklinde olduğu görülmektedir. Bu nedenle HMF üretim tepkimesinin birinci derece hız bağıntısından elde edilen denklemle ifade edilebileceği düşünülmüş ve GraphPad Prism 4 yazılımı kullanılarak nonlineer regresyon analizi yapılmıştır. Bu analizin sonunda birinci derece hız bağıntısının temsil ettiği eğrinin, deneysel verilerde elde edilen ve geometrik artış gösteren bu eğrilere uymadığı tespit edilmiştir. Daha sonra, tepkimenin sıfıncı derece olduğu varsayılarak değerlendirme yapılmış ve model sistemlerin derişim-zaman grafiklerindeki eğrilerin, HMF oluşumunun doğrusal artış gösterdiği kısımlarının eğimlerinden hız sabitleri hesaplanmıştır. HMF oluşumu için sıfıncı derece hız sabiti değerleri Çizelge 3.2' de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Farklı sıcaklıklardaki model sistemlerin ürettikleri HMF için hesaplanan hız sabitleri

Model sistem	Sıcaklık (°C)	k (mg l <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Glisin/glukoz	70	0,0059	0,8008
	80	0,0226	0,9892
	90	0,2577	0,9899
	100	0,6112	0,9800
	110	5,1316	0,9897
Glygly/glukoz	70	0,0092	0,9394
	80	0,0746	0,9746
	90	0,7222	0,9949
	100	0,3633	0,9979
	110	3,3355	0,9813
Glyglygly/glukoz	70	0,0065	0,7979
	80	0,0197	0,9967
	90	0,1462	0,9806
	100	0,3827	0,9983
	110	6,1136	0,7925
Glyglyglygly/glukoz	80	0,0089	0,9918
	90	0,2269	0,9696
	100	2,4573	0,9988
	110	9,3238	0,8444

Bu çizelgedeki değerlere bakıldığında glygly/glukoz hariç tüm model sistemlerde, sıcaklık arttıkça hız sabitinin değeri de artmaktadır. Glygly/glukoz sisteminde ise sadece 100°C için bulunan hız sabiti, 90 °C' dekinden daha düşüktür. Her bir sıcaklıktaki hız sabitleri model sistemlerdeki glisin, glygly, glyglygly ve glyglyglygly açısından karşılaştırıldığında Maillard tepkimesinde HMF üretim hızı bakımından aşağıdaki artan aktiflik sıraları gözlenmektedir.

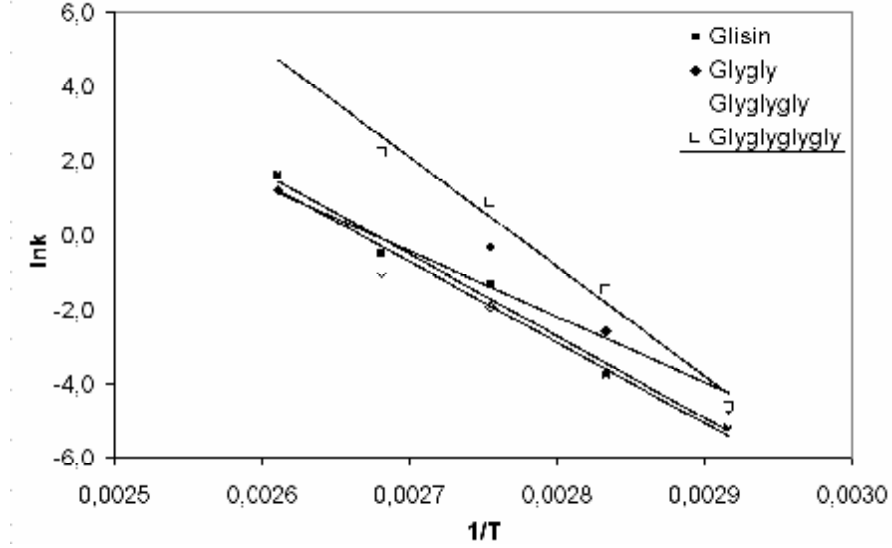
70°C : Glisin<glyglygly<glygly  
80°C : Glyglyglygly<glyglygly<glisin<glygly  
90°C : Glyglygly<Glyglyglygly<glisin<glygly  
100°C : Glygly<glyglygly<glisin<glyglyglygly  
110°C : Glygly<glisin<glyglygly<glyglyglygly

Amino grubu içeren bu bileşikler glisinden glyglyglygly' ye doğru artan birim sayısı nedeniyle artan molekül ağırlığına ve hacme sahiptir. Dolayısıyla sabit bir sıcaklıkta en aktif bileşiğin glisin, en az aktif olanın da glyglyglygly olması beklenen bir durumdur. 70, 80 ve 90°C' de glygly' nin en aktif, 100 ve 110 °C' de glyglyglygly' nin en aktif olmasını açıklamak oldukça zordur. 70, 80 ve 90°C' de, 100 ve 110 °C' ye göre genelde tepkime hızları daha yavaş olur. Aynı zamanda büyük moleküller, küçük moleküllere göre daha yavaş hareket eder. Tepkimede bir de, ilerleyen basamaklarda aminlerin yeniden oluşmaları gerçekleşmektedir. Kabaca, tepkimeye giren bir molekül için glisin, 1 molekül olarak yeniden oluşturulacaktır. Ama glygly' nin dönüşümü esnasında 1 molekül glygly yerine 2 molekül glisin oluşturulabilir ve bu durumda da tepkime hızı glisin/glukoz sistemine göre çok fazla olacaktır. Glyglygly ve glyglyglygly ise büyük moleküller olduklarından, bu sıcaklıklarda zaten az tepkime vereceklerdir. Geri dönüşümleri düşünüldüğünde 1 molekül glyglygly' den 3 molekül glisin veya 1 molekül glisin ile 1 molekül glygly; 1 molekül glyglyglygly' den 4 molekül glisin veya 2 molekül glygly, veya 1 molekül glisin ve 1 molekül glyglygly oluşturma ihtimalleri görülmektedir. Ancak tepkime hızları zaten 70, 80 ve 90°C' de çok yavaş olacak ve böylece 70, 80 ve 90°C' de en aktif bileşik glygly olacaktır.

100 ve 110 °C' de glyglygly ve glyglyglygly, düşük sıcaklıklara göre daha hızlı tepkimeye girecek ve geri dönüşümleri de hızlı olup belki 1 molekül glyglyglygly' den 4molekül glisin oluşacaktır. Bu durumda da 100 ve 110 °C' de en aktif molekül glyglyglygly olacaktır.

Deneysel verilerden elde edilen hız sabitleri, Arrhenius eşitliğine göre muamele edilince Şekil 3.48' de gösterilen Arrhenius grafikleri elde edilmiştir. Bu grafikler, sıcaklığa en hassas bileşiğin glyglyglygly olduğunu ortaya koymaktadır. Çizelge 3.3' te

Arrhenius grafiklerinden elde edilen her bir model sisteme ait aktivasyon enerjisi ve frekans faktörü verilmiştir. Bu çizelgeden de anlaşıldığı gibi, Maillard tepkimesinde HMF üretimi açısından incelenen bileşikler için artan aktivasyon enerjileri glygly<glyglygly<glisin<glyglyglygly şeklinde sıralanmıştır. Bu sonuç, bu konuda yapılan yorumlar doğrultusundadır



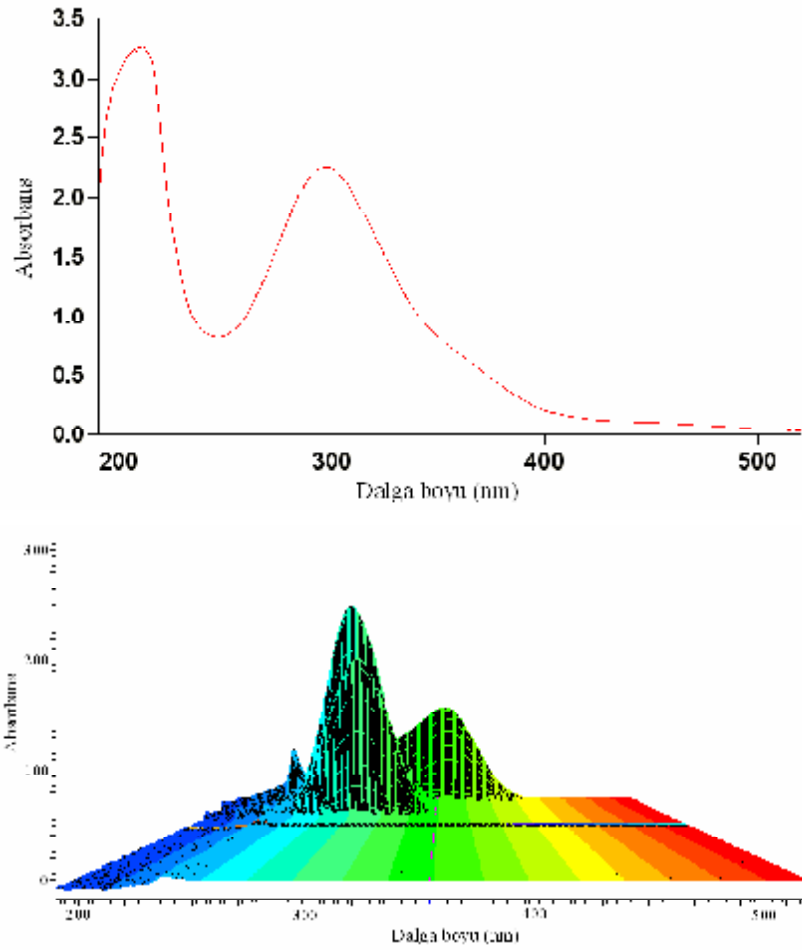
Şekil 3.48. HMF oluşumu için glisin ve peptitlerine ait Arrhenius grafikleri

Çizelge 3.3. Model sistemlerde HMF oluşumuna ait aktivasyon enerjisi ve frekans faktörü değerleri

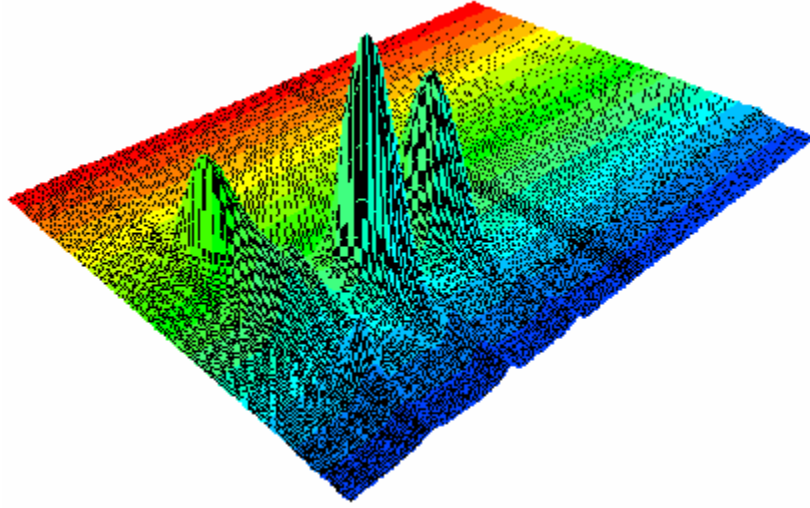
Model sistem	Ea (kJ/mol)	A (mg l <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Glisin/glukoz	184 (± 7)	4,74x10 <sup>25</sup>	0,9839
Glygly/glukoz	147 (± 5)	3,23x10 <sup>20</sup>	0,8898
Glyglygly/glukoz	181 (± 7)	1,48x10 <sup>25</sup>	0,9624
Glyglyglygly/glukoz	245 (± 15)	3,02x10 <sup>35</sup>	0,9777

İncelenen model sistemlerde HMF oluşumu HPLC ile takip edilirken detektörün 284 nm’ deki sinyalleri kaydettiği daha önce belirtilmişti. Bu analizler esnasında kararım miktarını da takip etmek amacıyla 420 nm’ deki sinyallerin de kaydedilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmanın sonunda elde edilen kromatogramlarda 420 nm’ de ortaya

ıkan bütün piklerin kararma miktarına katılan maddelere ait olduğu düşünülmüş ve bu piklerin integrasyonlarının toplamı kararma miktarı olarak kabul edilmiştir. HPLC' de kaydedilen spektro-kromatogramlara yalnızca spektrum boyutları görülecek şekilde bakıldığında bunların da UV-Vis spektrofotometresinde kaydedilen spektrumlardan farkının olmadığı grlmştir (şekil 3.49). 420 nm'de absorbens yapan tüm maddelerin kromatogram açısından görüntüsü ise birkaç grup şeklinde ve bunların hepsi toplam olarak değerlendirilmelidir (şekil 3.50).



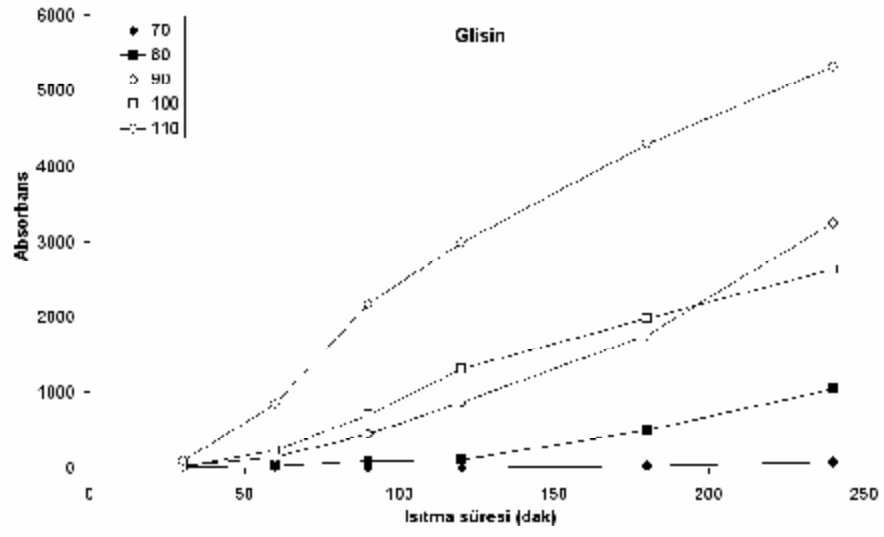
şekil 3.49. Glisin/glukoz sisteminin ısıtılmasıyla oluşan kararma rnlerinin UV-Vis spektrofotometresiyle (stte) ve HPLC' nin DAD ile kaydedilen spektro-kromatogramı (altta)



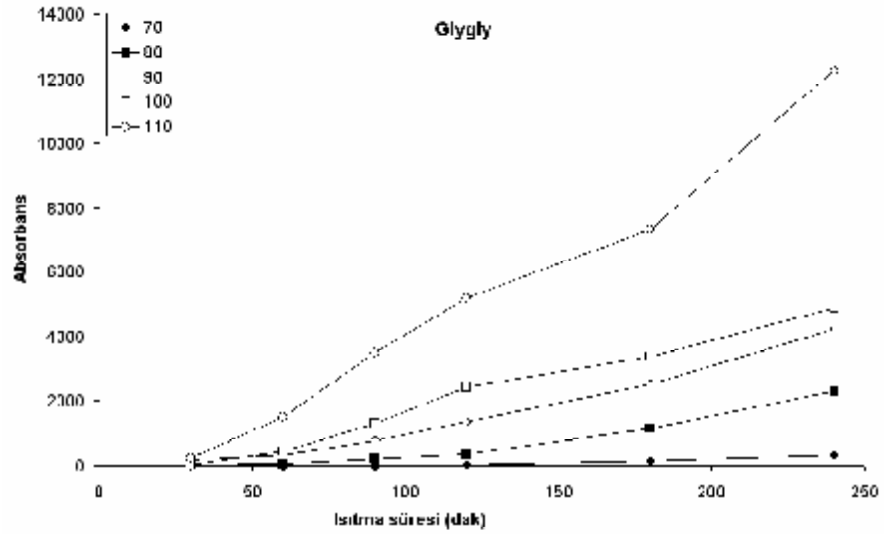
Şekil 3.50. Glisin/glukoz sistemine ait bir spektro-kromatogram

Farklı sıcaklıklardaki her bir model sisteme ait kromatogramdan elde edilen kararma miktarları kullanılarak, ilgili absorbands-zaman grafikleri çizilmiştir. Şekil 3.51, Şekil 3.52, Şekil 3.53 ve Şekil 3.54' te her bir model sisteme ait kararmanın, zamanla gelişmesi görülmektedir. Tüm grafiklerde, sıcaklığın yükselmesiyle kararmanın da belirgin farklarla arttığı bütün grafiklerde gözlenmektedir. Burada dikkati çeken bir nokta, glygly'nin sıcaklık arttıkça kararma miktarı bakımından diğerleri gibi düzgün olarak artmış olmasıdır. Çünkü HMF oluşumunun takip edildiği çalışmada gly-gly'nin 90°C'de, 100°C' den daha fazla HMF ürettiği gözlenmekteydi.

Kararmaya ait absorbands-zaman verileri arasında görülen doğrusal ilişki, tepkimenin sıfırıncı dereceden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Absorbans-zaman grafiklerinde çizilen en iyi doğruların eğimleri kararma hız sabitlerini vermiştir.

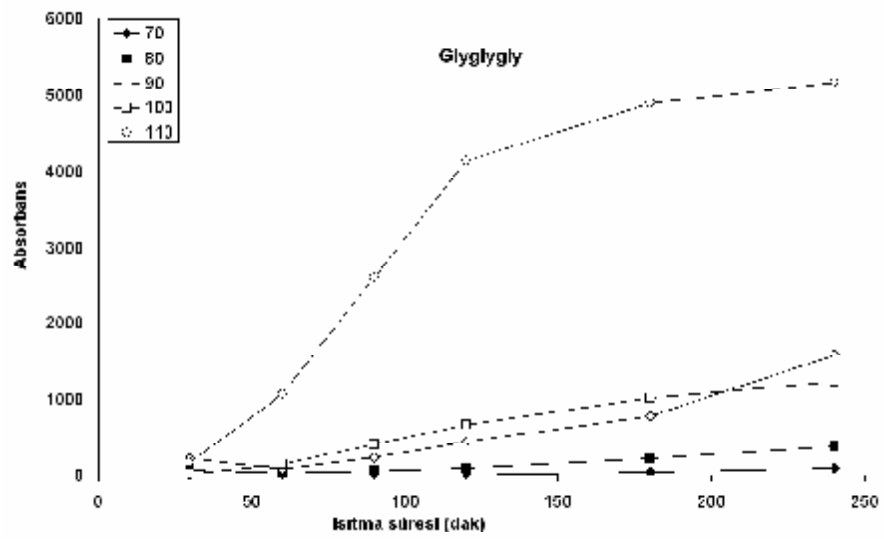


Şekil 3.51. Glisin/glukoz sisteminde kararma miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi

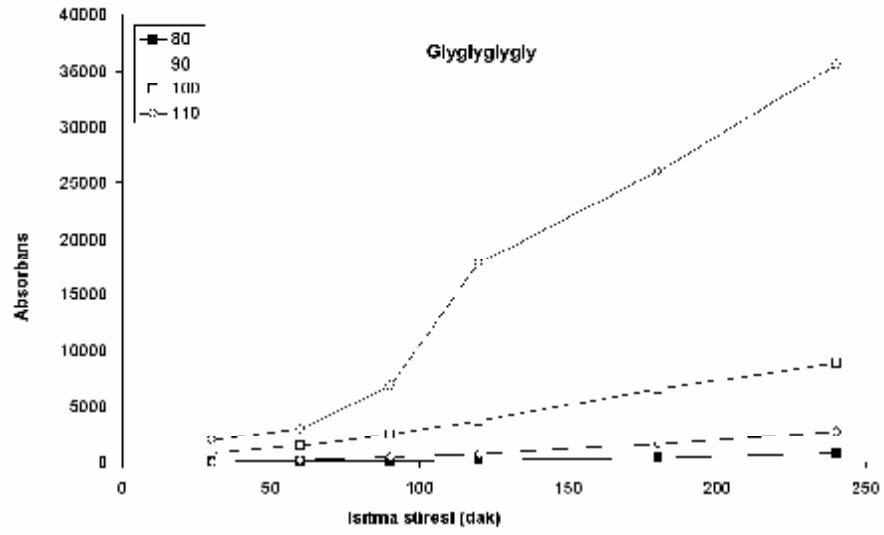


Şekil 3.52. Glygly/glukoz sisteminde kararma miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi





Şekil 3.53. Glyglygly/glukoz sisteminde kararma miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi



Şekil 3.54. Glyglyglygly/glukoz sisteminde kararma miktarının zamanla ve sıcaklıkla değişimi

Çizelge 3.4' te değişik model sistemler için farklı sıcaklıklarda hesaplanan hız sabitleri verilmiştir. Burada HMF oluşumunun takip edildiği çalışmada glygly için ortaya çıkan durumun glisinde ve glyglygly' de mevcut olduğu görülmektedir. Yani 90°C' deki k değeri 100°C' dekinden büyüktür. Glygly' de ise 90 ve 100°C' deki değerler birbirine çok yakındır.

Çizelge 3.5' te karar tepkimesi için hesaplanan aktivasyon enerjisi değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre yapılacak aktiflik sıralamasında yine glygly'nin birinci sırada yer aldığı görülmektedir. İkinci sırada glisin, üçüncü sırada fakat glisine çok yakın bir değerde glyglygly ve en son da glyglyglygly yer almıştır. Bu sıralamanın HMF oluşumunun takibiyle belirlenen aktivite sırasından önemli bir farklılık göstermediği açıktır.

Bu çalışmada Maillard tepkimesinde meydana gelen karar ve üretilen HMF için bulunan aktivasyon enerjisi değerlerini literatür araştırması sonucu bulunan değerlerle karşılaştırmak ve yorumlamak oldukça zordur. Maillard tepkimesinin kinetiği ile ilgili yayınlarda, başlangıç maddelerinin türü ve oranlarına, sıcaklığa, pH' ya, takip edilen maddenin cinsine bağlı olarak çok farklı hız sabitleri ve aktivasyon enerjileri hesaplandığı görülmektedir. Jousse vd (2002), Maillard tepkimesindeki karar ve HMF oluşumu için 66 yayını incelemiş ve tepkime koşullarına bağlı olarak aktivasyon enerjisinin 30-200 kJ/mol arasında hesaplandığını belirtmiştir. Rapor edilen aktivasyon enerji değerlerinin böyle geniş bir aralıkta oluşu, Maillard tepkimesinin karmaşık mekanizmasına ve çalışma koşullarının çeşitliliğine dayanmaktadır. Örneğin Stamp ve Labuza (1983) glisin/glukoz model sisteminde karar için aktivasyon enerjisini 64.8 kJ/mol olarak bildirirken, Barbanti vd (1990), değişik yüzdelerdeki glisin/glukoz model sistemleri için aktivasyon enerjisini 74-125 kJ/mol olarak hesaplamıştır. Martins vd (2005) ise, kompleks kinetik yöntemi uygulayarak Maillard tepkimesi için önerdikleri detaylı mekanizmada, her bir basamak için aktivasyon enerjisi verdiklerinden, sonuçları, bu çalışmada genel karar ve HMF oluşumu için elde edilen aktivasyon enerji değerleriyle tam olarak karşılaştırılamamaktadır.

Çizelge 3.4. Kararma miktarları için hesaplanan hız sabitleri

Model sistem	Sıcaklık (°C)	k (mg l <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Glisin/glukoz	70	0,636	0,9390
	80	7,802	0,9915
	90	18,527	0,9799
	100	12,963	0,9895
	110	33,503	0,9872
Glygly/glukoz	70	2,480	0,9925
	80	16,149	0,9894
	90	22,744	0,9895
	100	23,514	0,9890
	110	56,094	0,9935
Glyglygly/glukoz	70	0,735	0,9575
	80	2,426	0,9954
	90	8,684	0,9586
	100	6,120	0,9792
	110	44,758	0,9868
Glyglyglygly/glukoz	80	4,940	0,9548
	90	17,015	0,9995
	100	39,707	0,9926
	110	183,670	0,9759

Çizelge 3.5. Model sistemlerde kararmaya ait aktivasyon enerjisi ve frekans faktörü değerleri

Model sistem	Ea (kJ/mol)	A (mg l <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Glisin/glukoz	93 (± 1)	2,34x10 <sup>14</sup>	0,7881
Glygly/glukoz	73 (± 2)	5,18x10 <sup>11</sup>	0,8425
Glyglygly/glukoz	100 (± 1)	1,27x10 <sup>15</sup>	0,9015
Glyglyglygly/glukoz	126 (± 1)	5,97x10 <sup>19</sup>	0,9856

Çalışılan model sistemlerde HMF ve kararma oluşumunun her ikisinde de tepkimenin kinetik parametreleri kullanılarak tepkimeye giren söz konusu maddelerin aktiflikleri karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistik analizde ise tepkimeye etki eden faktörlerin, HMF ve kararma oluşumuna etkisi, derişimlerin ortalamaları karşılaştırılarak elde edilmiştir.

Verilere uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7' de görölmektedir. Çizelge 3.6' da verilen varyans analizine göre HMF oluşumunda esas etkiler olan sıcaklık ( $p < 0,0001$ ), madde türü ( $p < 0,0001$ ) ve ısıtma sürelerinin ( $p < 0,0001$ ) düzeyleri arasındaki farklılıklar önemlidir. Yani derişim, bu etkenler değiştikçe önemli ölçüde değişmektedir. Esas etkiler arasında yalnızca madde türü ve ısıtma süresi arasında interaksiyon görölmüştür ( $p > 0,0001$ ). Yani bu iki faktör çok az da olsa birbirini etkilemektedir. Esas etkiler arasında üçlü interaksiyon da bulunmamıştır. Zaten sıcaklık her iki etkiden de bağımsız bulunmuştur. Çizelge 3.7' ye bakıldığında ise tüm esas etkilerin birbirinden farklı ve esas etkiler arasında da ikili veya üçlü interaksiyonun olmadığı görölmektedir ( $p < 0,0001$ ).

Çizelge 3.6. HMF oluşumu için varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F değeri	P>F
Sıcaklık	3	1689,00	<,0001
Madde türü	3	56,08	<,0001
Sıcaklık x Madde türü	9	97,27	<,0001
Isıtma süresi	5	448,76	<,0001
Sıcaklık x ısıtma süresi	15	12,41	<,0001
Madde türü x ısıtma süresi	15	2,49	0,0022
Sıcaklık x Madde türü x ısıtma süresi	45	2,45	<,0001

Çizelge 3.7. Kararma oluşumu için varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F değeri	P>F
Sıcaklık	3	1040,74	<,0001
Madde türü	3	194,86	<,0001
Sıcaklık x Madde türü	9	53,39	<,0001
Isıtma süresi	5	876,72	<,0001
Sıcaklık x ısıtma süresi	15	12,72	<,0001
Madde türü x ısıtma süresi	15	10,54	<,0001
Sıcaklık x Madde türü x ısıtma süresi	45	5,04	<,0001

Her iki veri grubu için Duncan ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır. Bu testlerin sonuçları Çizelge 3.8’ de verilmiştir. Her iki çizelgede sıcaklık ve ısıtma sürelerinin her bir düzeyinin verileri arasındaki farkların önemli bulunduğu görülmektedir. Madde türlerine bakıldığında Çizelge 3.8’ de HMF oluşumunda glisin’in glyglyglygly ile her iki çoklu karşılaştırma testinde yakın ortalamalara sahip olduğu ve aralarındaki farkın önemli bulunmadığı göze çarpmaktadır. Kararma oluşumunda ise yalnızca Tukey testinde glisin ile glyglygly arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Bu testlerde azalan ortalamaya göre bir sıralama yapılırsa, HMF oluşumuna göre glygly > glyglyglygly = glisin > glyglygly ve kararma oluşumuna göre de glyglyglygly > glygly > glisin > glyglygly şeklinde dizilim elde edilmektedir. Fakat derişim-zaman grafiklerinde yapılan incelemeler, glyglyglygly’ nin HMF üretiminin 90°C’ den sonra hız kazandığını göstermektedir. 90°C’ den sonraki sıcaklıklarda glyglyglygly’ nin daha hızlı parçalanmaya başladığı ve başlangıçtaki amin bileşikleri derişimini arttırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle de HMF oluşturma miktarı bakımından glygly’ ye yakın bir ortalamaya ve kararma miktarı bakımından da glygly’ yi aşarak en büyük ortalamaya sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 3.8. Çoklu karşılaştırma testleri

HMF				Karama			
Gruplama	Ortalama değer	N	Sıcaklık	Gruplama	Ortalama değer	N	Sıcaklık
A	4,798	72	110	A	7,897	72	110
B	3,241	72	100	B	6,685	72	100
C	2,280	72	90	C	6,168	72	90
D	0,471	72	80	D	4,851	72	80
Madde Türü (Duncan)				Madde Türü (Duncan)			
A	3,169	72	Glygly	A	6,985	72	Glyglyglygly
B	2,623	72	Glyglyglygly	B	6,736	72	Glygly
B	2,596	72	Glisin	C	6,026	72	Gisin
C	2,401	72	Glyglygly	D	5,853	72	Glyglygly
Madde Türü (Tukey)				Madde Türü (Tukey)			
A	3,169	72	Glygly	A	6,985	72	Glyglyglygly
B	2,623	72	Glyglyglygly	B	6,736	72	Glygly
CB	2,596	72	Glisin	C	6,026	72	Gisin
C	2,401	72	Glyglygly	C	5,853	72	Glyglygly
Isıtma Süresi				Isıtma Süresi			
A	4,229	48	240	A	8,017	48	240
B	3,595	48	180	B	7,564	48	180
C	2,874	48	120	C	6,896	48	120
D	2,500	48	90	D	6,362	48	90
E	1,948	48	60	E	5,328	48	60
F	1,038	48	30	F	4,233	48	30

#### 4. SONUÇ

Bu çalışmada model sistemlerin gireceği Maillard tepkimesi sırasında tepken kaybının veya ürün oluşumunun anında FTIR spektrometresi ile takip edilebilmesi için FTIR'ın numune bölümüne yerleştirilecek özel bir düzenek hazırlanmıştır. Değişik pH ve sıcaklık koşullarında alanin/glukoz sistemindeki tepkime devam ederken anında spektrumları alınmış fakat özellikle tepkimenin sulu ortamda çalışılması nedeniyle beklenen deneysel verilerin toplanamayacağı ve FTIR tekniğinin bu çalışmada yararlı olamayacağı kararına ulaşılmıştır.

Maillard tepkimesinin UV-Vis spektrofotometre tekniği ile incelenmesinde model sistemler, spektrofotometrenin sıcaklık kontrollü küvetine yerleştirilmiş ve tepkime devam ederken çeşitli aralıklarla çözeltilerin 284 nm' deki spektrumları alınmıştır. Lysin/glukoz, lyslys/glukoz, lyslysys/glukoz, aspartik asit/glukoz, aspartil aspartik asit/glukoz, serin/glukoz, alanin/glukoz ve glisin/glukoz model sistemlerinin pH 7' de ve lizin/glukoz model sisteminin pH 6' da 35, 45 ve 55°C' de girdikleri Maillard tepkimelerinde üretilen HMF derişimlerine karşılık zaman verileri, çalışılan model sistemlerde HMF üretiminin sıfırcı dereceden bir tepkime ile gerçekleştiğini göstermiştir. Her bir model sistemde 45 ve 55°C' deki HMF üretimi için hız sabitleri hesaplanmıştır. Lyslys ve lyslysys' in bulunduğu ve ayrıca 35°C' de çalışılan hiçbir model sistemde önemli miktarda HMF oluşumu gözlenmemiştir. Sonuçlar lisinin serin, alanin ve glisinden daha hızlı bir şekilde HMF ürettiğini göstermektedir.

HPLC ile glukozun glisin, glygly, glyglygly ve glyglyglygly ile 70, 80, 90, 100 ve 110°C' de girdiği Maillard tepkimelerinin kinetiği incelenmiştir. HMF oluşumu 284 nm' de kararma tepkimesi 420 nm' de alınan çözelti kromatogramları ile takip edilmiştir. HMF oluşumunun ve kararmanın sıfırcı dereceden tepkimeler olduğu gözlemlenmiştir. Glukozun glisin ve glygly, glyglygly ve glyglyglygly ile tepkimelerinde HMF üretiminde 70, 80 ve 90°C' lerede en aktif bileşiğin glygly; 100 ve 110°C' lerede ise en aktif bileşiğin glyglyglygly olduğu anlaşılmıştır. Her bir model sistem için beş ayrı sıcaklıktaki HMF üretiminin hız sabitleri hesaplanmış ve aktivasyon enerjileri bulunmuştur. 70-110°C arasındaki HMF üretimi aktivasyon enerjileri

gly/glukoz sistemi için 183,7 kJ/mol, glygly/glukoz için 146,8 kJ/mol, glyglygly/glukoz için 180,7 kJ/mol ve glyglyglygly/glukoz için 245,1 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Kararma tepkimesi için hesaplanan aktivasyon enerjileri gly/glukoz, glygly/glukoz, glyglygly/glukoz ve glyglyglygly/glukoz sistemleri için sırasıyla 93,36 kJ/mol, 72,88 kJ/mol, 99,80 kJ/mol ve 125,60 kJ/mol dür.



## 5. KAYNAKLAR

- AJANDOUZ, E.H. and PUIGSERVER, A. 1999. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1786-1793.
- AKAGAWA, M., MIURA, T., SUYAMA, K. 2002. Factors influencing the early stage of the Maillard reaction. *International Congress Series*, 1245: 395-396.
- AKKAN, A.A., ÖZDEMİR, Y. and EKİZ, L. 2001. Derivative spectrophotometric determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) and furfural in Locust bean extract. *Nahrung/Food*, 45 (1): 43-46.
- AKPINAR, K. 2000. Maillard tepkimesinin model çalışmaları. Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü. 64 ss.
- AMES, J.M. 1998. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 62 (4): 431-439.
- AMEUR, L.A., TRYSTRAM, G., ARAGON, I.B. 2006. Accumulation of 5-hydroxymethylfurfural in cookies during the baking process: Validation of an extraction method. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 98 (4): 790-796.
- ARENA, E., FALLICO, B., and MACCARONE, E. 2001. Thermal damage in blood orange juice: kinetics of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde formation. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 145-151.
- ARTIGAS, P.F., HERNANDEZ, E.G. and VILLANOVA, B.G. 1999. Browning indicators in model systems and baby cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2872-2878.
- ASHOOR, S.H. and ZENT, J.B. 1984. Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science*, 49: 1206-1207.
- BAILEY, A.J., PAUL, R.G., KNOTT, L. 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106: 1-56.
- BAISIER, W.M. and LABUZA, T. 1992. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (5): 707-713.
- BARBANTI, D., MASTROCOLA, D. and LERİCİ, C.R., 1990. Early indicators of chemical changes in foods due to enzymic or non enzymic browning reactions. Part II: Colour changes in heat treated model systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23: 494-498.

- BELL, L.N. 1997. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chemistry*, 59 (1): 143-147.
- BRANDS, C.M.J, WEDZICHA, B.L. and VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2002. Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1178-1183.
- BRANDS, C.M.J., VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2003. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems. *Food Chemistry*, 83: 13-26.
- BRERETON, R.G.1990. Chemometrics Application of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems. Ellis Horwood Limited. Department of Chemistry, University of Bristol, England. 55 pp
- BUGLIONE, M. and LOZANO, L. 2002. Nonenzymatic browning and chemical changes during grape juice storage. *Journal of Food Science*, 67(4): 1538-1543.
- CAMMERER, B., JALYSCHKO, W. and KROH, L.W. 2002. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2083-2087.
- CAMMERER, B., JALYSCHKOV, V., KROH, L.W. 2002. Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *International Congress Series*, 1245: 269-273.
- CERUTTI, P., RESNIK, S.L., SELDES, A., and FONTAN, C.F. 1985. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: glucose loss, 5-hydroxymethylfurfural accumulation and fluorescence development due to nonenzymatic browning. *Journal of Food Science*, 50: 627-656.
- DAVIES, C.G.A., WEDZICHA, B.L. and GILLARD, C. 1997. Kinetic model of the glucose-glycine reaction. *Food Chemistry*, 60(3): 323-329.
- FAYOLLE, P.H., PICQUE, D., CORRIEU, G. 2000. On-line monitoring of fermentation processes by a new remote dispersive middle-infrared spectrometer. *Food Control*, 11: 291-296.
- FEATHER, M.S. and NELSON, D. 1984. Maillard polymers derived from D-glucose, D-fructose, 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde, and glycine and methionine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (6): 1428-1432.
- FERRER, E., ALEGRIA, A., FARRE, R., ABELLAN, P., ROMERO, F. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in

- infant formulas. Changes during heat treatment and storage. *Journal of Chromatography A*, 947: 85-95.
- GENTRY, T.S., ROBERTS, J.S. 2004. Formation kinetics and application of 5-hydroxymethylfurfural as a time-temperature indicator of lethality for continuous pasteurization of apple cider. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 327-333
- GIRIBET, M.C., RIBAS, A.I. 2000. Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44: 181-189.
- GÖÇÜŞ, F., WEDZICHA, B.L. and LAMB, J. 1998. Modelling of Maillard reaction during the drying of a model matrix. *Journal of Food Engineering*, 35: 445-458.
- HILL, V.M., LEDWARD, D.A. and AMES, J.M. 1996. Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 594-598.
- HODGE, J.E. 1953. Dehydrated Foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agricultural and Food Chemistry*, 1 (15): 928-943.
- JANZOWSKI, C., GLAAB, V., SAMIMI, E., SCHLATTER, J. and EISENBRAND, G. 2000. 5-hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 801-809.
- JIMENEZ, A.R., HERNANDEZ, E.G. and VILLANOVA, B.G. 2000. Browning Indicators in Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4176-4181.
- JOUSSE, F., JONGEN, T., AGTEROF, W., RUSSEL, S. and BRAAT, P. 2002. Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction. *Journal of Food Science*, 67(7): 2534-2542.
- KILIC, M., MUTHUKUMARAPPAN, K. and SUNDARAM, G. 1997. Kinetics of nonenzymatic browning in cheddar cheese powder during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21: 379-393.
- LEDL, F. and SCHLEICHER, E. 1990. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie*, 29 (6): 565-706.
- LEE, C.M., SHERR, B. and KOH, Y.N. 1984. Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 379-382.

- LERICI, C.R., BARBANTI, D., MANZANO, M. and CHERUBIN, S. 1990. Early indicators of chemical changes in foods due to enzymic or non enzymic browning reactions. 1: Study on heat treated model systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23: 289-294.
- LEONG, L.P., WEDZICHA, B.L. 2000. A critical appraisal of the kinetic model for the Maillard browning of glucose with glycine. *Food Chemistry*, 68: 21-28.
- LIU, Z.L., SLININGER, P.J., DIEN, B.S., BERHOW, M.A., KURTZMAN, C.P., GORSICH, S.W. 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 345-352.
- MARTINS, S.I.F.S., JONGEN, W.M.F. and VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 364-373.
- MARTINS, S.I.F.S., VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2003<sup>a</sup>. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chemistry*, 83: 135-142.
- MARTINS, S.I.F.S., MARCELIS, A.T.M., VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2003<sup>b</sup>. Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I-Reaction mechanism. *Carbohydrate Research*, 338: 1651-1663.
- MARTINS, S.I.F.S., VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2005<sup>a</sup>. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry*, 90: 257-269.
- MARTINS, S.I.F.S., VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2005<sup>b</sup>. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chemistry*, 92: 437-448.
- MAURON, J. 1981. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Progress in Food and Nutritional Science*, 5: 5-35.
- MENDOZA, M.R., OLANO, A., VILLAMIEL, M. 2002. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 79: 513-516.
- MENDOZA, M.R., SANZ, M.L., OLANO, A., VILLAMIEL, M. 2004. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 85: 605-609.

- MOLERO-VILCHEZ, M.D. and WEDZICHA, B.L. 1997. A new approach to study the significance of Amadori compounds in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 58(3): 249-254.
- MORALES, F.J. and PEREZ, S.J. 1998. Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the Amadori product in milk-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3885-3890.
- MORALES, F.J., FRAGUAS, C.F., PEREZ, S.J. 2005. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry*, 90: 821-827.
- MUNDT, S. and WEDZICHA, B.L. 2003. A kinetic model for the glucose-fructose-glycine browning reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3651-3655.
- MURKOVIC, M. and PICHLER, N. 2006. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50: 842-846.
- NAGARAJ, R.H., SADY, C. 1996. The presence of a glucose-derived Maillard reaction product in the human lens. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 382: 234-238.
- NARAYAN, K.A. and ANDREOTTI, R.E., 1989. Kinetics of lysine loss in compressed model systems due to Maillard reaction. *Journal of Food Biochemistry*, 13: 15-125.
- PETERSON, B.I., TONG, C-H., HO, C-T. and WELT, B.A., 1994. Effect of moisture content on Maillard browning kinetics of a model system during microwave heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1884-1887.
- PETRIELLA, C., RESNIK, S.L., LOZANO, R.D. and CHIRIFE, J. 1985. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high activity: color changes due to nonenzymatic browning. *Journal of Food Chemistry*, 50: 622-626.
- RAMIREZ-JIMENEZ, A., GARCIA-VILLANOVA, B and GUERRA-HERNANDEZ, E. 2001. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 513-518.
- RENDLEMAN, J.A. 1987. Complexation of calcium by melanoidin and its role in determining bioavailability. *Journal of Food Science*, 52 (6): 1699-1705.

- SILVAN, J.M., VAN DE LAGEMAAT, J., OLANO, A., DEL CASTILLO, M.D. 2006. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1543-1551.
- SIVASUNDARAM, L.R., FARHAT, I.A. and TAYLOR, A.J. 2002. On-line monitoring of the Maillard reaction. Abstracts of Papers of the American Chemical Society. American Chemical Society. Washington, DC, U.S.A. 279-378 pp.
- STAMP, J.A. and LABUZA, T.P. 1983. Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperature. *Journal of Food Science*, 48: 543-547.
- SULLIVAN, R. 1996. Contributions to senescence: non-enzymatic glycosylation of proteins. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 104 (7): 797-806.
- TEIXIDO, E., SANTOS, F.J., PUIGNOU, L., GALCERAN, M.T. 2006. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135: 85-90.
- VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung/Food*, 45 (3): 150-159.
- WAGNER, K-H., DERKITS, S., HERR, M., SCHUH, W., ELMADFA, I. 2002. Antioxidative potential of melanoidins is related to a roasted glucose-glycine model. *Food Chemistry*, 78: 375-382.
- WARMBIER, H.C., SCHNICKELS, R.A. and LABUZA, T.P. 1976. Nonenzymatic browning kinetics in an intermediate moisture model system: effect of glucose to lysine ratio. *Journal of Food Science*, 41: 981-983.
- YAYLAYAN, V. and FORAGE, N.G. 1991. Determination of the kinetics and mechanism of decomposition of tryptophan Amadori rearrangement product by RP-HPLC analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 364-369.
- YAYLAYAN, V. and FORAGE, N.G. 1992. A kinetic model for the reaction of tryptophan with glucose and mannose - the role of diglycation in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 44: 201-208.

- YAYLAYAN, V.A. and KAMINSKY, E. 1998. Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. *Food Chemistry*, 63 (1): 25-31.
- YEBOAH, F.K. and YAYLAYAN, V.A. 2001. Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. *Nahrung/Food*, 45 (3): 164-171.

**EK-1. UV-Vis verileri**

Çizelge 6.1. UV-Vis ile çalışılan model sistemlerin derişim-zaman değerleri

Zaman (dakika)	Sıcaklık (°C)	pH 6				pH 7					
		Lisin		Lisin		Serin		Alanin		Glisin	
		45	55	45	55	45	55	45	55	45	55
0		1,254	2,608	1,105	1,000	0,156	0,108	0	0,040	0,202	0,130
20		1,186	2,515	1,038	0,887	0,165	0,120	0	0,025	0,210	0,200
40		1,199	2,504	1,033	0,875	0,159	0,120	0	0,019	0,206	0,220
60		1,199	2,516	1,035	0,894	0,153	0,125	0	0,129	0,206	0,110
80		1,201	2,534	1,035	0,925	0,148	0,128	0	0,014	0,201	0,120
100		1,201	2,556	1,040	0,967	0,148	0,140	0	0,016	0,196	0,130
120		1,204	2,597	1,039	1,032	0,148	0,150	0	0,017	0,192	0,140
140		1,208	2,638	1,042	1,120	0,147	0,160	0	0,027	0,192	0,160
160		1,208	2,693	1,049	1,230	0,147	0,177	0	0,033	0,193	0,180
180		1,212	2,764	1,048	1,384	0,149	0,187	0	0,046	0,190	0,200
200		1,215	2,843	1,059	1,546	0,153	0,207	0	0,070	0,190	0,230
220		1,220	2,959	1,058	1,769	0,153	0,229	0	0,097	0,188	0,260
240		1,224	3,070	1,061	2,038	0,152	0,252	0	0,138	0,188	0,290
260		1,226	3,214	1,069	2,370	0,153	0,282	0	0,193	0,190	0,330
280		1,232	3,403	1,074	2,992	0,152	0,315	0,008	0,223	0,192	0,390
300		1,238	3,663	1,082	3,431	0,154	0,351	0,005	0,277	0,190	0,440
320		1,242	4,042	1,089	3,809	0,156	0,394	0,004	0,338	0,192	0,510
340		1,248	4,340	1,098	4,195	0,157	0,443	0,002	0,420	0,191	0,580
360		1,252	4,679	1,104	4,751	0,155	0,498	0,005	0,520	0,194	0,660
380		1,259	5,092	1,113	5,291	0,159	0,573	0,008	0,588	0,196	0,760
400		1,266	5,524	1,123	5,723	0,161	0,623	0,008	0,661	0,196	0,860
420		1,271	5,867	1,133	6,122	0,166	0,697	0,011	0,725	0,199	0,980
440		1,278	6,215	1,143	6,540	0,166	0,779	0,012	0,882	0,200	1,120
460		1,282	6,580	1,156	7,180	0,169	0,874	0,017	1,037	0,200	1,300
480		1,293	7,039	1,167	7,908	0,172	0,969	0,019	1,208	0,210	1,510
500		1,303	7,480	1,181	8,665	0,173	1,074	0,021	1,387	0,210	1,740
520		1,309	7,850	1,195	9,457	0,175	1,196	0,023	1,570	0,220	2,140
540		1,318	8,228	1,209	10,27	0,178	1,329	0,026	1,698	0,220	2,490
560		1,328	8,702	1,224	11,12	0,182	1,465	0,030	1,821	0,220	2,730
580		1,338	9,243	1,239	11,97	0,181	1,609	0,034	1,963	0,230	2,970
600		1,347	9,820	1,130	12,61	0,186	1,784	0,038	2,199	0,230	3,220
620		1,358	10,38	1,276	13,18	0,188	1,933	0,038	2,460	0,240	3,440
640		1,370	10,90	1,296	13,76	0,192	2,109	0,044	2,716	0,240	4,030
660		1,383	11,52	1,319	14,35	0,195	2,278	0,045	2,918	0,240	4,350
680		1,399	12,16	1,340	15,28	0,196	2,456	0,051	3,076	0,250	4,690
700		1,412	12,73	1,361	16,23	0,200	2,671	0,053	2,254	0,250	5,040
720		1,427	13,22	1,384	17,17	0,206	2,953	0,056	3,555	0,250	5,400

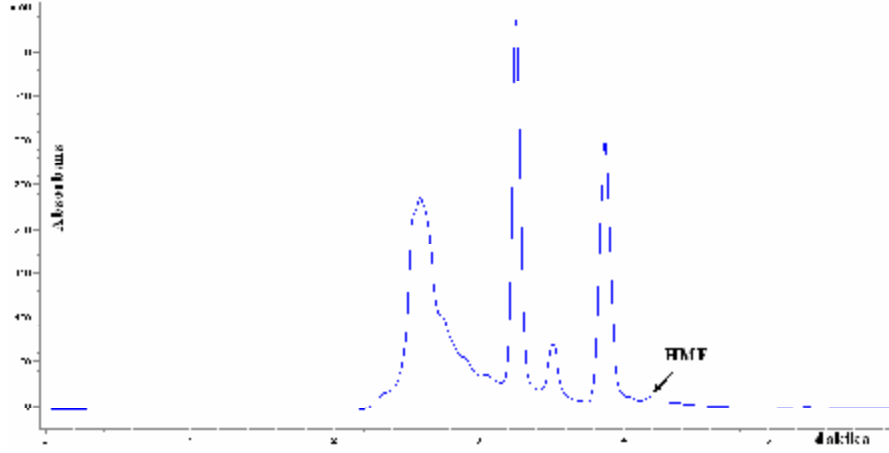
(Devamı sonraki sayfada)



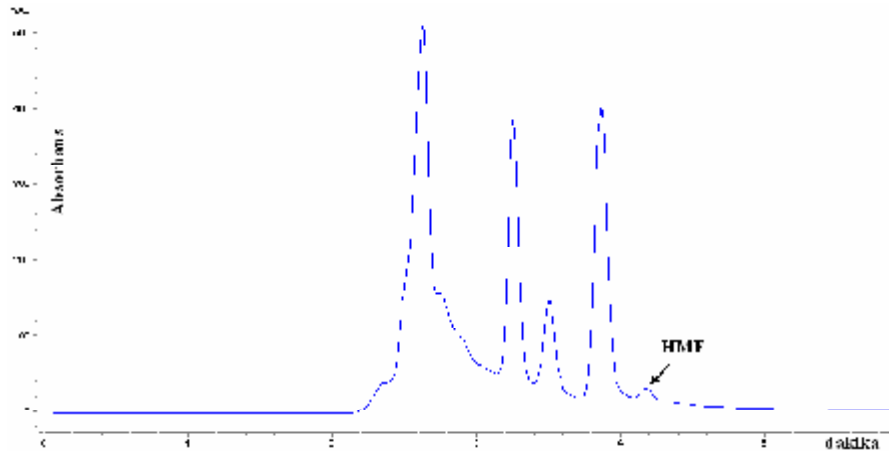
Çizelge 6.1' in devamı

Zaman (dakika)	Sıcaklık (°C)	pH 6				pH 7					
		Lisin		Lisin		Serin		Alanin		Glisin	
		45	55	45	55	45	55	45	55	45	55
740		1,442	13,69	1,413	17,98	0,212	3,193	0,061	3,865	0,260	5,760
760		1,458	14,35	1,437	18,61	0,215	3,410	0,063	4,178	0,260	6,150
780		1,476	15,08	1,467	19,28	0,221	3,631	0,065	4,392	0,270	6,550
800		1,493	15,81	1,496	19,84	0,227	3,901	0,072	4,596	0,270	6,940
820		1,511	16,58	1,524	20,53	0,228	4,379	0,075	4,773	0,280	7,350
840		1,528	17,31	1,561	21,51	0,234	4,601	0,081	5,114	0,280	7,750
860		1,548	17,92	1,595	22,39	0,238	4,827	0,083	5,474	0,290	8,190
880		1,567	18,49	1,628	23,10	0,245	5,068	0,092	5,846	0,300	8,620
900		1,588	19,05	1,671	23,56	0,251	5,380	0,095	6,154	0,300	8,960
920		1,609	19,79	1,704	24,10	0,253	5,886	0,101	6,438	0,310	9,300
940		1,634	20,57	1,746	24,42	0,258	6,059	0,107	6,634	0,310	9,650
960		1,634	21,32	1,797	24,62	0,262	6,234	0,114	6,897	0,320	9,990
980		1,654	22,01	1,826	24,73	0,270	6,615	0,118	7,310	0,320	10,32
1000		1,679	22,74	1,873	24,71	0,277	6,915	0,127	7,725	0,330	10,69
1020		1,710	23,27	1,919	24,77	0,282	7,434	0,130	8,154	0,330	10,98
1040		1,732	23,68	1,965	24,77	0,290	7,726	0,138	8,572	0,340	11,48
1060		1,759	24,11	2,025	24,69	0,295	8,013	0,144	8,997	0,350	11,97
1080		1,790	24,66	2,067	24,86	0,304	8,322	0,148	9,382		12,49
1100		1,816	25,17	2,124	24,82	0,310	8,649	0,154	9,689		
1120		1,850	25,60	2,180	24,93	0,316	9,098	0,167	9,961		
1140		1,880	25,90	2,240	24,96	0,328	9,559	0,169	10,35		
1160		1,913	25,99	2,298	25,09	0,334	9,823	0,177	10,87		
1180		1,945	26,29	2,360	24,99		10,16	0,180	11,34		
1200		1,981	26,42	2,429	25,13		10,54	0,185	11,74		
1220		2,014	26,41	2,501	24,98		10,91	0,199	12,11		
1240		2,051	26,24	2,584	24,98		11,32	0,202	12,32		
1260		2,124	26,70	2,683	24,90		11,85	0,207	12,78		
1280		2,165	26,56		25,15		12,22	0,224	13,00		
1300		2,208	26,62		24,99		12,48	0,229	13,49		
1320		2,253	26,65		25,22		12,79	0,236	13,95		

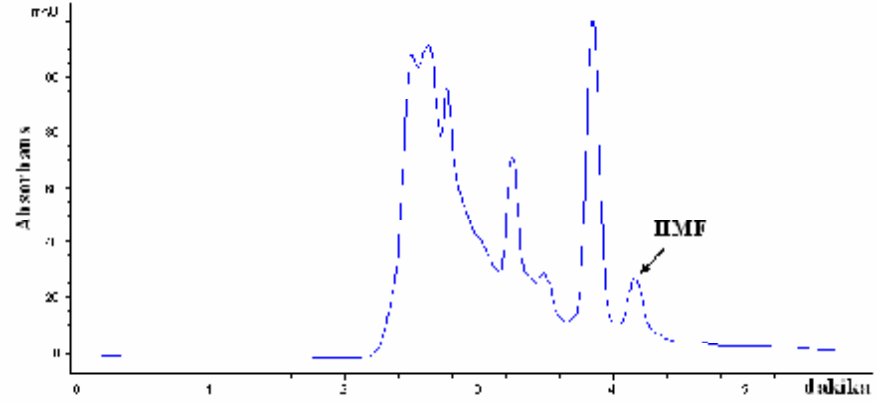
EK-2. Örnek HPLC kromatogramları



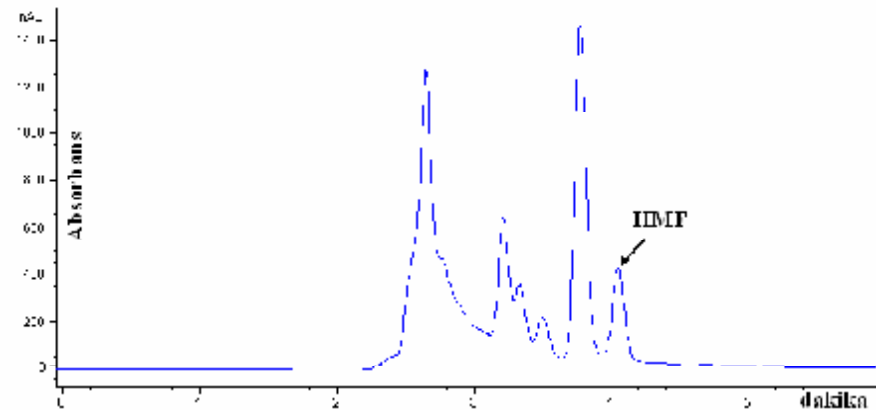
Şekil 6.1. 80°C' de glisin/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram



Şekil 6.2. 90°C' de glygly/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram



Şekil 6.3. 100°C’ de glisin/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram



Şekil 6.4. 110°C’ de glyglyly/glukoz karışımına ait 240. dakikaya ait kromatogram

**EK-3. HPLC kromatogramlarına ait veriler**

**Çizelge 6.2. Glisin/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri**

Isıtma süresi (dak.)	Sıcaklık (°C)	Pik integrasyonu														
		70			80			90			100			110		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>30</b>		0	0	0	0	0	5,7	2,6	21,6	34,1	38,7	119,06	120,6	234,1	235,1	209,9
<b>60</b>		0	0	0	4,3	7,2	5,5	30,0	62,3	77,9	256,4	616,7	655,1	1546,0	1238,4	1423,3
<b>90</b>		0	0	0	10,4	12,4	9,1	68,1	219,1	228,5	689,8	692,8	1100,8	2966,3	1910,4	3107,3
<b>120</b>		0	0	0	17,4	26,0	20,8	174,6	331,0	318,1	1174,2	1511,3	1786,8	4862,5	3281,3	66,6
<b>180</b>		0	2,5	2,1	39,6	73,4	62,2	538,7	771,7	789,0	1977,4	2626,3	2629,5	13597	9299,9	10687
<b>240</b>		0	4,8	4,6	86,2	129,8	119,2	927,1	1517,5	1428,0	3745,4	3982,5	4083,1	18619	22077	29124

Çizelge 6.3. Glygly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri

		<i>Pik integrasyonu</i>															
Isıtma süresi (dak.)	Sıcaklık (°C)	70			80			90			100			110			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<b>30</b>		0	0	0	0	0	0	5,3	296,7	324,1	352,1	0	55,5	56,54	352,6	283,7	389,3
<b>60</b>		0	0	0	14,5	0	26,5	1065,5	1749,8	1807,9	156,1	307,3	341,7	2031,5	695,7	2173,7	
<b>90</b>		0	0	0	45,4	38,5	58,2	1541,2	3109,3	3317,3	452,7	453,6	534,9	4842,6	1942,0	2084,9	
<b>120</b>		0	0	0	69,5	50,7	47,7	2281,3	3877,4	3031,4	696,0	1010,6	972,8	6214,2	6316,5	4610,4	
<b>180</b>		0	10,5	7,4	203,8	144,9	141,7	3545,5	5169,2	4271,6	1834,1	1569,6	1629,8	11909	9660,4	10806	
<b>240</b>		11,9	21,6	15,4	375,6	424,7	262,9	4831,8	6632,1	6397,1	2357,8	2162,5	2521,5	24870	13441	18876	

Çizelge 6.4. Glyglyly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon değerleri)

Isıtma süresi (dak.)	Sıcaklık (°C)	Pik integrasyonu														
		70			80			90			100			110		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>30</b>		0	0	0	0	4,7	0,9	9,3	13,4	12,7	4,6	92,5	41,8	29,3	269,5	515,6
<b>60</b>		0	0	0	8,3	7,7	6,5	31,7	39,7	39,1	136,0	295,9	272,1	1675,1	1395,6	2000,4
<b>90</b>		0	0	0	18,2	13,2	31,1	81,5	98,4	105,0	277,6	364,9	389,7	4252,1	1653,8	3857,5
<b>120</b>		0	0	0	19,2	27,9	26,6	154,4	145,8	128,7	844,4	698,5	880,8	5861,2	6900,2	4814,9
<b>180</b>		0	5,8	5,4	55,8	67,8	57,0	365,5	349,1	378,2	1455	1575,9	1604,5	6655,6	13992	1100,1
<b>240</b>		0	7,7	8,5	103,6	118,3	89,1	706,9	716,7	760,5	2268,1	2557,2	2017,9	38365	30635	21977

Çizelge 6.5. Glyglyglyly/glukoz model sisteminde HPLC kromatogramlarından HMF oluşumuna ait elde edilen pik alanı (integrasyon) değerleri

Isıtma süresi (dak.)	Sıcaklık (°C)	Pik integrasyonu												
		80			90			100			110			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<b>30</b>		0	0	0	0	0	0	0	164,6	179,2	234,1	1941,6	1488,7	1696,0
<b>60</b>		0	0	0	1,0	0,6	2,8	420,9	441,2	480,3	2949,0	1665,9	2534,5	
<b>90</b>		0	0	0	25,4	13,3	43,2	1137,8	1273,6	1106,5	7632,7	6043,7	10597	
<b>120</b>		0	0	0	95,6	52,2	114,6	2519,6	2788,5	2420,3	13999	16359	18442	
<b>180</b>		0,9	4,5	1,0	403,2	309,6	493,9	6828,7	7243,3	7511,8	19712	20756	22687	
<b>240</b>		12,7	14,2	29,0	782,5	688,5	1515,5	11521	13022	12689	62624	57944	30175	

## ÖZGEÇMİŞ

Kudret AKPINAR 1973 yılında Antakya’ da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Edirne’ de, lise öğrenimini de Antalya’ da tamamladı. 1993 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ nden 1997 yılında Kimyager olarak mezun oldu. Eylül-1997’ de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevi sürdürmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.