

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

**KAKAO TOZUNA KEÇİBOYNUZU TOZU İLAVESİ İLE YAPILAN
TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİ AMACIYLA YENİ BİR METODUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ahmet Alp KARAMANOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2016

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

**KAKAO TOZUNA KEÇİBOYNUZU TOZU İLAVESİ İLE YAPILAN
TAĞŞİŞİNİN BELİRLENMESİ AMACIYLA YENİ BİR METODUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ahmet Alp KARAMANOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 112O494 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

2016

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

**KAKAO TOZUNA KEÇİBOYNUZU TOZU İLAVESİ İLE YAPILAN
TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİ AMACIYLA YENİ BİR METODUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ahmet Alp KARAMANOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 05/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Doç. Dr. Mustafa Kemal USLU

Yrd. Doç. Dr. H. Reyhan ÖZİYCI

ÖZET

KAKAO TOZUNA KEÇİBOYNUZU TOZU İLAVESİ İLE YAPILAN TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİ AMACIYLA YENİ BİR METODUN GELİŞTİRİLMESİ

Ahmet Alp KARAMANOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARHAN
Aralık 2016, 34 sayfa

Bu çalışmada kakao tozuna keçiboynuzu tozu ilavesi ile yapılan tağşışın belirlenmesi için yeni bir yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kakaoda bulunmayan ancak keçiboynuzunda bulunan D-pinitol adlı şeker alkol işaretleyici olarak kullanılmıştır. Genel olarak gıda analizlerinde örnek hazırlama aşamalarında kullanılan Carrez çözeltileri, aktif kömür, PVPP ve perlit örneklerde farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Kromatogramın pürüzsüzlüğü yönünden en uygun kromatogram elde edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, her bir maddenin diğer maddelerin farklı konsantrasyonları ile kullanıldığında sonuçlarının ne olacağı incelenmiştir. Denemeler sonucunda en uygun örnek hazırlama yöntemi olarak örneğe 0,05 mL Carrez I ve 0,05 mL Carrez II çözeltilerinin uygulanmasını takiben 0,50 g/L aktif kömür, 0,50 g/L PVPP uygulanması bulunmuştur. Diğer yandan, aktif kömürün karbonhidratları tuttuğu göz önüne alınırsa şeker kompozisyonunun belirlenmesinin amaçlanmadığı durumlarda artan miktarlarda aktif kömür uygulanmasının da olumlu sonuçlar verebileceği gözlenmiştir. Perlit uygulamasının ise örnek hazırlamada etkili olmadığını gözlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda keçiboynuzu tozu ile katkılanmış ve belirlenen koşullarla muamele edilmiş örnekler HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Farklı tağşış oranlarındaki örneklerden elde edilen kromatogramların D-pinitol piki alanlarına göre bir doğru denklemi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denkleminin yararlanılarak piyasadan satın alınan kakao tozu örneklerinde keçiboynuzu tozu tağşışının varlığı ve tağşış oranı belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, piyasadaki örneklerde keçiboynuzu tozu tağşışine rastlanmazken, ticari örneklerden bir tanesinin azotlu organik bileşen içeriğinin diğer örneklerde göre yaklaşık % 50 daha az olduğu gözlenmiştir. Ancak bu tağşışin niteliği belirlenememiştir.

Sonuç olarak kakao tozuna keçiboynuzu tozu katkısının belirlenebileceği bir örnek hazırlama yöntemini de içeren kromatografik bir yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntemin ticari örneklerin kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Kakao tozu, keçiboynuzu tozu, tağşış

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)
Doç. Dr. Mustafa Kemal USLU
Yrd. Doç. Dr. H. Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

DEVELOPMENT A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF ADULTERATION IN COCOA POWDER WITH CAROB POWDER

Ahmet Alp KARAMANOĞLU

M. Sc. Thesis in Food Engineering Department
Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN
December 2016, 34 pages

In this study, it is aimed to determine a new method for detection of adulteration with carob powder in cacao powder. On this purpose, a sugar alcohol called D-pinitol which is an ingredient of carob but is not found in cocoa was used as marker. Carrez solutions, activated charcoal, PVPP and perlite which are generally used in sample preparation in food analyses were applied to the samples with different concentrations during sample preparation stage. With these applications, it was aimed to obtain appropriate chromatogram in terms of smoothness. It was also aimed to have a better understanding on the effects of different concentrations of each substance in the combination. In the end of optimization study, the most suitable preparation method was found as the combination of 0,05 mL Carrez I solution, 0,05 mL Carrez II solution, 0,50 g /L activated charcoal and 0,50 g/L of PVPP. On the other hand, increasing active charcoal concentration gave positive results by the means of sugar adsorption even though determination of sugar composition was not the main objective of this study. Besides, perlite was determined as non-effective agent on sample preparation.

The samples, intentionally added with carob powder at different concentrations and treated with determined conditions, were analyzed at HPLC. A linear equation was provided by the peak areas of D-pinitol from obtained chromatograms of samples at different adulteration ratios. The obtained calibration equation was used to determine the presence and level of carob powder adulteration to commercial cacao powders. As a result of the analyses, No carob powder adulteration was determined in commercial samples but one of the commercial cacao samples had 50% less nitrogenous organic compounds compared to the other samples. However, the characteristics of adulteration could not be described.

Consequently, a new sample preparation and chromatographic analysis method for determination of cocoa adulteration with carob powder was defined. This method is thought to be used successfully in qualification of commercial samples.

KEY WORDS: Cocoa powder, carob powder, adulteration

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Mustafa Kemal USLU
Asst. Prof. Dr. H. Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

İnsanoğlunun var oluşundan beri gıdalara hile yapıldığı bilinmektedir. Çok eski tarihlerde gıdalarda tağşiş yapan üreticilere idam cezasına varan yaptırımlar uygulanırken, son yıllarda ülkeden ülkeye değişmekle beraber hapis cezası, üretimden men etme ve maddi para cezaları verilmekte ve hatta firmalar kamuoyuna duyurulmaktadır. Son yıllarda kamuoyuna duyurulan bu firmaların genellikle et ve süt ürünleri alanında üretim gösterdikleri görülmektedir. Bunun sebebi olarak ise bu gıdalara yapılan tağşişi belirleyebilecek geçerli analiz yöntemlerinin ve teknik personelin mevcut olması görülmektedir. Gerçekte bu gruplar dışındaki pek çok gıdada da tağşiş yapılmaktadır.

Kakao tozuna kavrulmuş ve öğütülmüş keçiyoynuzu tozunun ilave edilmesi de ticari çıkar amaçlı tağşiş yapanların son yıllarda başvurduğu yöntemlerden birisidir. Hâlihazırda hem kakao tozu standardında hem de kakao ve benzeri ürünler tebliğinde bu tağşişin belirlenmesine yönelik bir yöntem veya düzenleme yer almamaktadır. Bu projede kakao tozunda olmayan ancak keçiyoynuzunda doğal olarak bulunan D-pinitol adlı şeker alkolün işaretleyici olarak kullanılarak bu hilenin belirlenmesine yönelik bir metod çalışması araştırılmak istenmiştir. Aslında keçiyoynuzu örneklerinin D-pinitol içeriğini belirlemeye yönelik olarak proje ekibi tarafından kullanılan yöntem keçiyoynuzu tozu ilave edilmiş kakao tozu örneklerinde kullanılabilmekte ancak bu yöntemin uygulanabilirliği gıda matriksinden kaynaklanan safsızlıklar nedeniyle kısıtlı olmaktadır. Bu projenin amacı Carrez çözeltileri, aktif karbon, PVPP ve perlit gibi gıda numunelerinin analize hazırlanmalarında meyve suyu endüstrisinde sıkça kullanılan maddeler ile kakao tozunun standart ekstrakt örneklerinin analize hazırlanmaları ve bu şekilde HPLC sisteminde kolayca analiz edilebilmelerine olanak sağlamaktır.

Bu proje ile hedeflenen örnek hazırlama yöntemi tanımlanmış, farklı oranlarda keçiyoynuzu tozu kakao tozuna katılarak örnek hazırlama metodu kullanılmış, sonucunda bir denklem elde edilmiş ve geçerli bir analiz yöntemi belirlenmiştir. Bu projenin gerçekleştirilmesi için projeyi (Proje No: 112O494) destekleyen TÜBİTAK'a, her türlü harcama ve yazışma işlemlerinde yardımcı olan TÜBİTAK personeline ve laboratuvar çalışmalarında emek sarf ederek bana yardımcı olan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Kakao	3
2.2. Keçiboynuzu.....	5
2.3. Taklit ve Tağşiş	7
2.4. Filtrasyon ve Durultma Yardımcı Maddeleri	9
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Ön Denemeler.....	10
3.2. Örnek Hazırlama Amacıyla Denenen Yöntemler.....	10
3.2.1. Örnek hazırlama denemelerinde kullanılmış olan tağşiş edilmiş..... karışımın hazırlanması	10
3.2.2. Carrez durultması	11
3.2.3. Aktif kömür uygulaması	12
3.2.4. PVPP uygulaması	12
3.2.5. Perlit uygulaması	12
3.2.6. Filtre yardımcı maddeleri ve Carrez durultmasının bir arada uygulanması	14
3.3. Analiz Yöntemleri	14
3.3.1. Örneklerin D-pinitol ve karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi.....	14
3.3.2. Örneklerin absorban değerlerinin belirlenmesi.....	14
3.3.3. Azotlu organik bileşen miktarı analizi.....	15
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Ön Denemeler.....	16
4.2. Metot Geliştirme	17
4.2.1. Kontrol grubu olan S1 örneğinden elde edilen kromatogram	17

4.2.2. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda Carrez durultması uygulanması ile elde edilen sonuçlar	18
4.2.3. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda aktif kömür uygulanması ile elde edilen sonuçlar	19
4.2.4. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda PVPP uygulanması ile elde edilen sonuçlar	19
4.2.5. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda perlit uygulanması ile elde edilen sonuçlar	20
4.2.6. S1 örneğine farklı filtrasyon ve durultma yöntemleri uygulanması sonucunda elde edilen örneklerin absorbans değerleri	21
4.3. Farklı Filtrasyon ve Durultma Uygulamalarının Kombinasyonları ile Elde Edilen Bulgular	21
4.3.1. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Carrez ve Aktif kömür, artan..... konsantrasyonlarda PVPP uygulanması ile elde edilen bulgular	22
4.3.2. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Carrez ve PVPP, artan..... konsantrasyonlarda Aktif kömür uygulanması ile elde edilen bulgular	23
4.3.3. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Aktif kömür ve PVPP, artan..... konsantrasyonlarda Carrez uygulanması ile elde edilen bulgular	24
4.4. Tağşiş Oranını Belirleyecek Standart Denklemin Eldesi	26
4.5. Piyasadan Satın Alınan Ticari Kakao Tozu Örneklerinde, Çalışmada Geliştirilen Yöntem ile D-pinitol Belirlenmesi	27
4.6. Piyasadan Satın Alınan Ticari Kakao Tozu Örneklerinin Azotlu Organik Bileşen.. İçerikleri.....	27
5. SONUÇ	29
6. KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Derece Santigrat
%	Yüzde

Kısaltmalar

A	Aktif Kömür ile Durultulan Örnek Kodlaması
Ca	Carrez Çözeltileri ile Durultulan Örnek Kodlaması
dk	Dakika
FAO	Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
g	Gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
kg	Kilogram
KM	Kuru Madde
L	Litre
m	Metre
m ²	Metrekare
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
P	Perlik ile Filtre Edilen Örnek Kodlaması
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone (Poli Vinil Poli Prolidon)
PV	PVPP ile Durultulan Örnek Kodlaması
RID	Refractive Index Detector (Refraktif İndeks Dedektörü)
rpm	Rotate Per Minute (devir/dakika)
S1	Seyreltik 1 (% 20 oranında keçiboynuzu tozu ile taşıyıcı edilmiş karışım)
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kakao meyvesi ve bitkisi	3
Şekil 2. 2. D-pinitolün kimyasal yapısı	8
Şekil 4. 1. Kakao tozu ve kakao tozu + Keçiboynuzu tozu..... kromatogramların karşılaştırılması.....	16
Şekil 4. 2. Kakao tozu, kakao tozu + Keçiboynuzu tozu ve saf D-pinitol'e..... ait kromatogramların karşılaştırılması.....	16
Şekil 4. 3. S1 örneğinden kromatografik analiz sonucunda elde edilen..... kromatogram 18	
Şekil 4. 4. S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda uygulanan Carrez durultması ile.... elde edilen kromatogramlar.....	18
Şekil 4. 5. S1 örneğine farklı konsantrasyonda aktif kömür uygulanması ile elde..... edilen kromatogramlar	19
Şekil 4. 6. S1 örneğine farklı konsantrasyonda PVPP uygulanması ile elde edilen..... kromatogramlar	20
Şekil 4. 7. S1 örneğine farklı konsantrasyonda perlit uygulanması ile elde edilen..... kromatogramlar	20
Şekil 4. 8. S1 örneğine minimum konsantrasyonda Carrez (0,025 mL/örnek), aktif kömür (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda (0,5 g/L, 10 g/L, 40 g/L) PVPP uygulanması ile elde edilen kromatogram	22
Şekil 4. 9. S1 örneğine minimum konsantrasyonda Carrez (0,025 g/örnek),..... PVPP (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda (0,5 g/L, 10 g/L, 20 g/L) aktif kömür uygulanması ile elde edilen kromatogram	23
Şekil 4. 10. S1 örneğine minimum konsantrasyonda aktif kömür (0,5 g/L), PVPP (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda Carrez (0,025 mL/örnek, 0,05 mL/örnek,..... 1 mL/örnek) uygulanması ile elde edilen kromatogram	24
Şekil 4. 11. S1 örneğine artan konsantrasyonda aktif kömür, PVPP ve Carrez..... uygulanması ile elde edilen kromatogram	25
Şekil 4. 12 S1 örneğine minimum konsantrasyonda aktif kömür (0,5 g/L), PVPP (0,5 g/L) ve Carrez (0,025 mL/örnek) uygulanması ile elde edilen kromatogram	26
Şekil 4. 13. Farklı oranlarda keçiboynuzu ile tağışış edilen kakao tozu örneklerinin	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1. Örnek çözeltilerinin 400 kat seyreltikten sonraki absorbands değerleri... 21
- Çizelge 4.2. S1'e yapılan uygulamalar ile elde edilen örneklerin absorbands değerleri .21
- Çizelge 4.3. Sabit Carrez ve Aktif kömür konsantrasyonlarında artan PVPP.....
konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbands değerleri22
- Çizelge 4.4. Sabit Carrez ve PVPP konsantrasyonlarında artan Aktif kömür.....
konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbands değerleri23
- Çizelge 4.5. Sabit Aktif kömür ve PVPP konsantrasyonlarında artan Carrez.....
konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbands değerleri24
- Çizelge 4.6. Piyasadan satın alınan kakao tozu örneklerinin (Örnek no:2-14) ve.....
keçiboynuzu tozunun (Örnek no:15) azotlu organik bileşen içerikleri 28

1.GİRİŞ

Son yıllarda gerek T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın yaptığı denetimlerde ve gerekse de medyada görülen "gıda terörü" haberlerinde gıdalara uygulanan taklit ve tağşişte üreticilerin başvurduğu yöntemler resmi makamların yanı sıra tüketicileri de tedirgin etmiştir. Gıdalarda yapılan tağşiş ve taklitin önlenmesi amacıyla Bakanlığımız, yapılan rutin denetimleri artırarak piyasadaki ürünlerin uygun bir şekilde üretilebilmesini hedeflemiştir.

Hile yaptıkları tespit edilen ve kamuoyu ile paylaşılan firmaların genellikle insan sağlığını doğrudan etkileyen et ve kanatlı ürünleri ve süt ürünleri gibi sektörlerde faaliyet gösterdikleri görülmüştür. Genel olarak bu sektörlerde hilelerin tespit edilebilmesinin en önemli sebeplerinden birisi önem sırasında bu gruptaki gıdaların denetiminin birinci sıraya konulması ve muhtemel hilelerin tespitinde geçerli ve uygulanabilir analiz yöntemlerinin hâlihazırda mevcut olmasıdır. Ancak farklı gıda gruplarına da bir takım hilelerin yapılması muhtemel olsa bile bunların tespiti ve denetimi hususunda pek fazla bir adım atılmamaktadır. Bunun muhtemel sebebi ise farklı hileleri tespit edebilmek için yöntemlerin bulunmaması ve dolayısıyla bu yöntemlerin eğitimli uzman personel tarafından yapılamamasıdır.

Son yıllarda hile yapılan ürünlere kakao tozunun da dâhil olduğu görülmektedir. Çalışmanın çıkış noktası da bu tağşişin yapıldığının farkına varılmasıdır. Keçiboynuzu ve ürünleri üzerine ticari faaliyet göstermekte olan bir gıda firmasının kavrulmuş keçiboynuzu tozu üretiminde arzu ettiği renkte üretim yapamaması üzerine çalışma ekibimizden yardım talebinde bulunmuştur. Konu incelendiğinde ise üretimin, kakao tozu paketleyen bir firmanın 2 ton siparişte bulunması ile gerçekleştiği firma sahibi tarafından ifade edilmiştir. Bunun üzerine yapılan piyasa araştırmasında piyasada kilogram fiyatı 6 TL'den 20 TL'ye kadar değişen fiyatlarda kakao tozu satıldığı ve kakao tozuna eklenmiş keçiboynuzu tozunu bunu belirlemeye yönelik herhangi bir yasal düzenlemenin ve yöntemin olmadığı belirlenmiştir.

Piyasada farklı fiyatlarla satışa sunulan kakao tozları özellikle pastane, otel, hazır yemek üreten yemek firmaları gibi toplu üretim yapan firmalar kullanmaktadır. Bir başka ifade ile satışa sunulan kakao tozlara kavrulmuş keçiboynuzu tozu ilave edilerek hile yapılmakta ve daha ucuz ürünler piyasaya arz edilmektedir. Literatürde bu hileyi kesin olarak belirlemeye yönelik herhangi bir bilgi ve yöntem bulunmamaktadır. Sadece son ürünün şeker kompozisyonundan yola çıkarak kakao tozuna keçiboynuzu tozunun ilave edilme ihtimalinin belirlenebileceği belirtilmektedir. Bu projenin amacı kakao tozunda doğal olarak bulunmayan fakat keçiboynuzunda doğal olarak bulunan D-pinitol ile bu hilenin çok küçük miktarlarının dahi belirlenebileceği, güvenilir, hızlı, yaygın olarak kullanılan laboratuvar cihazları ile tespit edilebilen ve doğru sonuç verebilecek bir yöntemin geliştirilmesidir.

Çalışma kapsamında yürütülen laboratuvar çalışmaları sonucunda keçiboynuzu tozu ilave edilen örneklerde bu ilavenin belirlenmesini sağlayacak yeni bir yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntem kullanılarak piyasadaki toplanan ticari kakao tozu örnekleri

hileli olup olmadıkları hususunda yönünden incelenmiştir. Çalışma sonucunda ulaşılan yöntemin güncel Kakao ve Kakao Ürünleri Tebliği'nde bu taşışın belirlenmesinde kullanılabileceği düşünölmektedir. Bunun yanında uygunluğu saptanan bu yöntemin yalnızca kakao tozunda değil kakao tozu kullanılarak üretilen diğer ürünlerde de hilenin belirlenmesi amacıyla kullanılma potansiyeli ihtimal dâhilindedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kakao

Ebegümeçigiller familyasından 4 - 8 metre boyunda bir bitki türü olan kakaonun (*Theobroma cacao*) meyveleri (tohum keseleri) 15 - 20 cm uzunluğundadır ve her tohum kesesi kakao çekirdeği (tohumu) olarak bilinen 30 - 40 adet tanecik içermektedir. Kırmızımsı-kahverengi tonlarında olan kakao çekirdekleri kurutma ve fermentasyon işlemi sonrasında açığa çıkmaktadır, keseden çıktıklarında ise dış kısımları beyaz, tatlı bir parşömen öz ile kaplı olmaktadır (Minifie 1982).



Şekil 2. 1. Kakao meyvesi ve bitkisi (Anonim, 2016)

Bitkinin doğal yetişme alanı özellikle Brezilya, Meksika ve Venezuela toprakları olmakla beraber, Fildişi Sahilleri toplam üretimin % 40'ını gerçekleştirerek üretimde lider konumda bulunmaktadır. Toplam üretim miktarında Fildişi Sahilleri'ni % 15'lik oranla Gana ve Endonezya takip etmektedir (Anonymous, 2016a). Bitkinin, bu ülkeler dışında Hindistan ve Karayipler gibi tropik bölgelerin genelinde yetiştirildiği, genel olarak yetiştirme alanlarının ise ekvatorun 15° kuzey ve güney paralelleri arasında olduğu bildirilmiştir (Mainers vd 1984).

Kakao bitkisi, yetiştiği bölgeye göre değişmekle beraber yılda iki kere hasat edilmektedir. Hasat sonrasında, çekirdekler bıçak yardımı ile meyveden ayrılıp özel hazırlanmış kutulara yerleştirilerek, 5 - 7 gün süreyle fermentasyon işlemine tabi tutulmakta ve buna bağlı olarak çekirdeklere yapışık olan etli kısım gevşemektedir. Fermentasyon sırasında oluşan biyokimyasal olaylar sonucunda istenen renk ve aroma oluşmakta ve çekirdeğe sarılı olarak bulunan parşömen (kabuk) kısmı çekirdekten ayrılmaktadır (Korkubilmez 2005). Uygulanan bazı çalışmalar fermente olan kakaoda 24 adet suş maya olduğunu ortaya çıkarmıştır. Fermentasyon işlemi, mayaların posa içindeki şekeri alkol ve karbondioksit dönüştürmesiye başlar. Daha sonra bakteriler, alkolü laktik asit okside ederler ve sonrasında koşullar daha anaerobik hale dönüştüğünde asetik asit oluşur. Bu olay ile ortamda ısı oluşur ve 24 saat içerisinde sıcaklık yükselir. Bakteriler fermentasyon tamamlanmaya kadar aktivitesini sürdürmeye devam eder. Kakao fermentasyonunda bulunan mikroorganizmalar toprak,

ağaç, v.s. çevresel ortamlardan gelirler. Bu aşamada en sık bulunan türler *Saccharomyces spp*'dir (Beckett 2009).

Fermentasyon işlemine tabi tutulmuş kakao çekirdekleri güneşte kurutulmakta, kurutma işlemi, materyalin nem içeriği % 7'ye düşene kadar devam etmekte ve bu işlemler ile tohumu sarmış olan parşömen kısmın gevrek bir yapı kazanarak sonraki aşamalarda kabuktan kolayca ayrılabilir bir hal almaktadır (Minifie 1989).

Kurutma işlemi sonrasında ise gevrek bir yapı kazanmış olan parşömen; taş, toprak ve diğer yabancı maddeler, elek veya aspiratör vasıtası ile kakao çekirdeklerinden ayrılmaktadır. Yabancı materyalden arındırılmış olan kakao çekirdekleri kavurma işlemine tabii tutulmakta, kavurma işlemi sırasında renk ve aromada değişiklikler meydana gelmektedir. Bu işlem ile kakaonun sahip olduğu serbest aminoasitler, peptidler, indirgenmiş şekerler değişime uğrayarak kakaonun kendine özgü aromaya sahip olmasını sağlamaktadır. (Misnawi vd 2004; Barel vd 1985; Mohr vd 1976). Ayrıca çekirdek üzerinde yapışık halde kalmış olan kabuk parçaları da bu süreçte çekirdekten daha kolay uzaklaşmaktadır. Elde edilen çekirdekleri yaklaşık % 2 - 3 nem, % 54 yağ içeriğinde öğütmeye alınmaktadır. İstenilen kalite parametrelerine ulaşmak için gerektiğinde paçal hazırlanabilmektedir. Öğütme esnasında ürün öncelikle macun kıvamına gelmekte sonrasında ise daha akışkan (kakao likörü) bir yapıya kavuşmaktadır. Kavurma işlemi 115 - 140°C' de, 40 - 60 dakika ya da 200°C'de 15 - 20 dakikada yapılmakta, kavurma esnasında % 4 - 7 oranında nem kaybı olmaktadır (Minifie 1989).

Kakao tozu üretiminde kullanılan kakao likörünün geliştirilmesi ve istenilen renk tonları ve aromanın elde edilmesi için kakao likörüne alkalizasyon işlemi uygulanmaktadır. Alkalizasyon işleminin istenilen parametreye göre öğütmeden önce veya sonra uygulanabilmekte ancak aktif olarak öğütmeden sonra yapılan uygulamalar kullanılmaktadır (Drouven vd 1996). Alkalizasyon işleminde potasyum veya sodyum karbonat solüsyonlarının kullanılmaktadır. Alkalizasyon esnasında basınç ile birlikte kakao keki ve yağı ayrılmakta, ayrılan kek kakao tozu halini almaktadır. Yağ ise gıda ve kozmetik sanayiinde kullanılmaktadır (Beckett 2009).

Forsyth ve Quesnel (1963); kakao tohumlarında yaklaşık % 9-10 oranında karbonhidrat bulunduğunu saptamıştır. Reineccius vd (1972) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise taze kakao çekirdeklerinin % 2 - 4 oranında serbest şeker içerdiğini sonucuna ulaşmıştır. Berbert (1979) yaptığı çalışmada, az miktarda galaktoz, rafinoz, inositol gibi şekerleri de içerdiğini gözlemlemiştir. Bu şekerlerin kakao çekirdeğinin fermentasyonu sonucu çeşitli değişikliklere uğramakta olduğu, sakaroz miktarı iyi fermente edilmiş çekirdeklerde sifıra kadar gidebildiği, buna karşı fruktoz ve glukoz miktarlarında artış görüldüğünü bildirmiştir. İyi fermente edilmemiş kakao çekirdeklerinde ise yaklaşık % 1 oranında sakaroz mevcuttur (Bracco vd 1969). % 5 oranında nişasta içeren çekirdeğin toplam yağ içeriğinin ise fermentasyon işlemi ile değişikliğe uğramamaktadır (Lehrian ve Patterson 1983).

Kakao çekirdeklerinin bileşimi incelendiğinde, tanenin yüksek oranda yağ içerdiği görülmüştür. Kakao çekirdekleri çoğunlukla, % 50-55 yağ, % 12-15 azotlu

organik bileşen,%10-15 fenolik bileşenler, %9-10 karbonhidrat, % 5 nem, % 1,46 kül, % 1,09 teobromin ve % 0,44 kafein içerdiği bildirilmiştir (Beckett 2009).

Türk Gıda Kodeksi Kakao ve Kakao Ürünleri Tebliği'ne göre kakao tozu "Temizlenmiş, kabuğu soyulmuş ve kavrulmuş kakao çekirdeğinin toz haline getirilmesi ile elde edilen ve kuru madde üzerinden kütlece en az % 20 oranında kakao yağı içeren toz haldeki ürün" olarak tanımlanmaktadır. Bu tebliğde kakao tozuna ait kalite kriterleri olarak sadece içermesi gereken maksimum rutubet miktarı belirtilmiş, bunun yanında ortofosforik asit, bazı tatlandırıcılar ve interesterifiye risinoleik poligliserol esterleri gibi katkı maddelerinin belli dozlarda kullanılabilceği belirtilmiştir (Anonim 2012). Bunun dışında kakao tozunun taşınması gereken kriterlere dair herhangi bir düzenleme veya kısıtlamanın bulunmadığı görülmektedir.

2.2. Keçiboynuzu

Yeryüzünün en eski bitkilerinden birisi olarak bilinen keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), Leguminosae familyasının Ceasalpinaceae alt familyasına ait, çok yıllık bir bitki olduğu bildirilmiştir (Karkacier ve Artık 1995). Keçiboynuzu bitkisi, Akdeniz ikliminin görüldüğü 30° - 45° kuzey ve güney enlemlerini kapsayan bölgelerde yetişmektedir. Düşük sıcaklıklara duyarlı olan bitkinin, -4°C'nin altındaki sıcaklıklarda zarar görebilmektedir, keçiboynuzu ağacının, 10 m uzunluğunda geniş enli, koyu renkli ve dayanıklı dalları olan bir bitkidir. Güçlü kök yapısına sahip olması sebebiyle çok az suya gereksinim duymakta ve kuraklıkta bile meyve verebilmektedir, ağacının yaprakları; 4 - 5 cm büyüklüğünde, oval, açık yeşil renkte olup, bitki kışın yaprak dökmemektedir (Yalım 2010).

Keçiboynuzu ağacı, ekonomik ömre 10 - 15 yaşında ulaşmakta ve sonraki her yıl meyve miktarı ve kalitesi artmaktadır. Olgun bir ağacın yıllık meyve verimi 90 - 115 kg arasında değişmektedir (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

TS 2907'e göre "*Ceratonia siliqua* L. türüne giren ağaçların bakla biçimindeki meyvesidir" şeklinde tanımlanan keçiboynuzu meyveleri, Mayıs ayında büyümeye, Haziran ve Temmuz aylarında ise olgunlaşmaya başlamaktadır. Meyvenin olgunlaştıkça yeşilden koyu kahve rengine dönüşmekte ve olgun meyvelerin hasadı Eylül ayında başlayıp mevsim koşullarına bağlı olarak Aralık ayına kadar devam edebilmektedir. Hasat edildiğinde ise uçları hafif yeşil olan meyveler depolanmadan önce güneşte kurutularak tüketime hazır hale getirilmektedir (Anonim 1977, Yalım 2010)

Ülkemizde keçiboynuzu, Akdeniz ikliminin görüldüğü Anadolu'nun güney ve batı kesimlerinde; İzmir'in Urla ilçesinden Hatay'ın Samandağ ilçesine kadar olan 1750 km'lik sahil şeridinde 1 - 2 km'lik iç kısımlara kadar ve Çukurova, Kozan ve Mersin bölgelerine bakıldığında ise 25 km'lik iç kısımlara kadar yetişmektedir (Yalım 2010).

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) istatistik verileri; dünyada keçiboynuzu yetiştirilen toplam alanın % 50'den fazlasına Avrupa'nın Akdeniz kıyı şeridinde bulunan ülkelerde olduğunu bildirmektedir. Türkiye ise toplam üretim alanı ile dünyada 6. sırada yer almaktadır (Anonim 2015).

Dünyanın birçok yerinde yetişen keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında; cins, bölge ve iklime bağlı olarak genellikle adet başına 6 - 32 g ağırlığında, 7 - 14 adet tohum içeren meyveler üretmektedir (Barracosa vd 2007, Sidina vd 2007).

Uluslararası standartlara göre keçiboynuzu meyvesi, keçiboynuzu ağacının (*Ceratonia siliqua* L.) olgun ve kuru meyvesi olup kendine özgü şekilde, uzunluğu en az 12 cm, bozuk meyve oranı en fazla % 9,5, küflü ya da çürük oranı en fazla % 0,5, kırık oranı en fazla % 25, gelişmemiş meyve oranı en fazla % 3 ve yabancı madde oranı en fazla % 1 olmalıdır (Anonymous 1987). Keçiboynuzu meyvesinin genel özellikleri TS 2907 Keçiboynuzu (Harnup) Standardı'na göre en az 5 cm uzunluğunda, koyu kahverenginde, kendine özgü biçim, tat ve kokuda olmalıdır. İçerisinde kırık keçiboynuzu miktarı ağırlıkça % 25'den, gelişmemiş meyve oranı % 3'ten, yabancı madde oranı % 1'den, bozuk meyve oranı % 10'dan, küflü ya da çürük oranı % 0,5'ten fazla olmamalı ve içerisinde canlı ya da cansız böcek bulunmamalıdır (Anonim 1977).

Keçiboynuzu meyvesi genel olarak ağırlıkça % 90 oranında meyve etinden, % 10 oranında ise çekirdek kısmından oluşmaktadır. Kimyasal bileşiminin ise meyvenin cinsi, yetiştirildiği bölge, hasat zamanı (olgunluk), yetiştiği toprak ve iklim özelliği ile kültürel tekniklere bağlı olarak oldukça değişkendir. Yapılan çalışmalar sonucunda, kavrulmamış keçiboynuzu meyvesinin yaklaşık % 65-70'i suda çözünür kuru madde, % 10-12'i nem, % 7-8'si azotlu organik bileşen, % 7-8'si ham selüloz, % 4-5'i kül ve % 0,7-1,1'i yağdan oluşmaktadır (Ayaz vd 2007, Karkacier ve Artık 1995, Yousif ve Alghzavi 2000).

Avallone ve ark. (1997), keçiboynuzu çekirdeği üzerine yaptıkları çalışmalarda çekirdek bileşiminin ortalama % 9 nem, % 1 kül, % 1 azotlu organik bileşen, % 1,1 yağ, % 0,4 sakaroz, % 0,1 D-glikoz, % 0,1 D-fruktoz, % 0,1 nişasta ve 0,66 mg/g toplam fenolik madde içeriğinin olduğunu saptamışlardır. Kavrulmuş keçiboynuzu (meyve eti) tozu ise yaklaşık % 62 toplam şeker, % 6 azotlu organik bileşen, % 3 kül, % 1,5 selüloz ve % 0,2 yağ içermektedir (Yurdagel ve Teke 1985).

Keçiboynuzu ununun kakao ikame edici olarak kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, keçiboynuzu ununun (keçiboynuzu meyvesine kendine has kokusunu veren izobutirik asidin kavurma işlemiyle uzaklaştırılmasından sonra) % 25 - 30'a kadar eklendiğinde tat ve aroma açısından duyuusal yöntemlerle kakaodan farkının anlaşılmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple, keçiboynuzunun çikolata ve şekerleme kaplamasında formüle eklenebileceği bildirilmiştir (Meer 1979). Keçiboynuzunda yüksek oranda bulunan izobutirik asit (6,3 - 9,4 g izobutirik asit/kg KM), meyvenin kullanım potansiyelini azaltan kötü kokuya neden olmaktadır (Berna vd 1997).

Yapılan çalışmalarda, keçiboynuzunun kafein ve teobromin içermemesinin yanında kakaoya göre daha yüksek oranda fruktoz ve daha düşük oranda yağ içermektedir (Graig ve Nguyen 1984). Ayrıca Meer (1979) yaptığı çalışmada keçiboynuzu tozunun kakaoya göre daha fazla diyet lifi ve şeker içerdiğini gözlemlemiştir.

Keçiboynuzu meyvesi; kahve çekirdeği, kakao ve benzer diğer meyveler gibi toz haline getirilmekte, kavrulmuş veya kavrulmamış haldeki keçiboynuzu unu

doğrudan gıda katkısı olarak kullanılabilir. Kavurma işlemi esnasında meyvenin şeker, azotlu organik bileşen ve yağ derişimi azalırken azotlu organik bileşen ve indirgen şekerlerin varlığında Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon artmakta, bu olaylar sonucunda keçiyoynuzu unu daha buruk bir aromaya sahip olmakta ve kakao tozundan duyusal olarak daha zor ayırt edilebilir bir hal almaktadır (Roseiro vd 1991). Ayrıca kavurma işleminden kısa zincirli yağlar gibi uçucu bileşenleri de etkilenmekte; keçiyoynuzu ununun karakteristik kokusunu oluşturan izobütirik asit de keçiyoynuzunun 160°C de 30 dk kavrulması ile yaklaşık % 30 oranında parçalanmaktadır (Berna vd 1997).

2.3. Taklit ve Tağşış

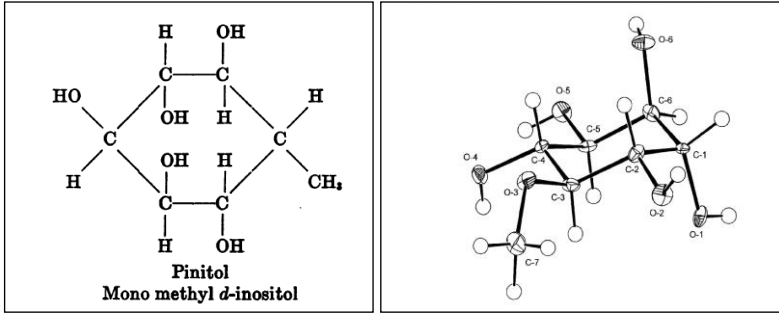
Türk Gıda Kodeksi'nde **taklit**, “ürünlerin şekil, bileşim ve nitelikleri itibarıyla yapısında bulunmayan özelliklere sahipmiş gibi veya başka bir ürünün aynısıymış gibi gösterilmesi” şeklinde tanımlanmıştır. **Tağşış**'in tanımı ise “ürünlere temel özelliğini veren öğelerin ve besin değerlerinin tamamının veya bir bölümünün mevzuata aykırı olarak çıkarılması veya miktarının değiştirilmesi veya aynı değeri taşımayan bir başka maddenin, o madde yerine aynı maddeymiş gibi gösterilmesi” şeklindedir (Anonim, 2010).

Gıdaların hilelerinin ardındaki tetikleyici sebep, üründe bir kısım veya tamamen düşük fiyatlı bileşenler kullanıp pahalı olan bir ürünü ucuza mal ederek yüksek kar sağlamaktır. Tarihte zeytinyağı gibi stratejik öneme sahip gıdalarda tağşışlerin yapılageldiği görülmektedir. Günümüzde teknolojinin ve iletişimin de gelişmesiyle beraber farklı gıda gruplarında farklı yöntemler kullanarak çeşitli hileler yapılmaktadır. Son yıllarda hile yapılan gıda maddelerine kakao tozu da eklenmiştir. Tüketicilerin gıda güvenliği ve kalitesi konusunda gittikçe bilinçlenmesiyle, gıda ürünleri hilelerinin belirlenmesinde yeni tekniklerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu hileyi gerçekleştiren gıda üreticilerinin ileri teknikleri kullanmasından dolayı hile ve yanıltmayı klasik analiz teknikleri ile belirlemek oldukça zorlaşmaktadır. Bu nedenle gıdalarda taklit ve tağşışı belirleyecek yeni yöntemlerin gelişmesi önemlidir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada kakao tozuna tağşışte kullanılması muhtemel olan kakao kabuğu, soya unu, keçiyoynuzu tozu ve fındık kabuğu katkıları ile çeşitli karışımlar elde edilmiş ve karışımlara uygulanan tağşış örneklerde yapılan karbonhidrat, aminoasit, kül, ham lif, teobromin, kafein, toplam alkaloid, azotlu organik bileşen analizleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucunda; kakao tozu, kakao kabuğu ve keçiyoynuzunun farklı konsantrasyonlarda teobromin, kafein ve toplam alkaloid içerdiği fakat fındık kabuğunun ve soya ununun bu maddeleri içermediği bildirilmiştir. Bu üç maddeden sadece kafein içeriğine ait veriler kullanılarak bu maddelerle yapılacak olan tağşışin belirlenemeyeceği, ancak teobromin ve toplam alkaloid içeriği ile bu tip tağşışin saptanabileceği ifade edilmiştir. Karbonhidrat kompozisyonları yönünden ise sadece keçiyoynuzu tozu tağşışinin nitel olarak belirlenebileceği ancak oransal olarak herhangi bir sonuca ulaşamadığı bildirilmiştir. Soya unu tağşışinde azotlu organik bileşen analizinin belirleyici olarak kullanılabilmesi de gösterilmiştir (Altug ve Gonul 1988). Literatürde kakao tozundaki tağşışin belirlenmesine yine kakao ve aynı zamanda keçiyoynuzunda bulunan alkaloidler

vasıtasıyla sonuca ulaşılmaya çalışıldığı, bunun yanında karbonhidrat içeriği yönünden sadece nicel olarak kısmi bir sonuca varılabildiği görülmektedir. Bu nedenle tağşişin belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan işaretleyici maddenin kakaoda doğal olarak bulunmayan ancak keçiyoynuzunda doğal olarak bulunan bir madde olması gerekliliğinin önemini ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmalarda keçiyoynuzu gibi baklagiller de insülin benzeri etki gösteren D-pinitol adı verilen bir şeker alkolün yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir. D-pinitol çam ağacı, yonca, nohut, karanfil gibi bitkilerde ve soya ve keçiyoynuzu gibi baklagillerde doğal olarak bulunan bir bileşiktir. (Streeter 2001, Kim vd 2005). D-pinitol bitkiler âleminde kuraklık ve sıcaklık salınım periyotları boyunca bitkilerin toleransını arttırmak ve ozmotik stresi azaltmak için bünyesinde oluşturduğu (Guo ve Oosterhuis 1995, Orthen ve Popp 2000, Chiera vd 2006, Merchant vd 2006), bitkiyi soğuk ve kuraklığa karşı koruyan, erime noktası 183 - 185°C olan yapısal olarak bir siklohegzigol (3-o-metil-chiro-inositol) olarak tanımlanmaktadır (Gorham vd 1984, Orthen ve Popp 2000, Orthen vd 2000).



Şekil 2. 2. D-pinitolün kimyasal yapısı (Dozois vd 1938, Dowd ve Stevens 2002)

Kakao tozuna başta kakao çekirdeği kabuklarının tozu, soya unu, keçiyoynuzu tozu, fındık kabuğu tozu gibi çok farklı maddelerin katılarak tağşiş yapılmaktadır. Özellikle soya unu ilavesi durumunda son ürünün azotlu organik bileşen içeriğinden yola çıkılarak soya unu tağşişinin belirlenmesine yönelik uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler bulunmaktadır (Altug ve Gonul 1988). Buna karşın son yıllarda, uluslararası literatürde kakao tozuna keçiyoynuzu ilavesinin oransal belirlenebileceği konuları içeren herhangi bir yayına rastlanmamıştır (Albright vd 1978). Sadece 1986 yılında keçiyoynuzunun bileşimi üzerine yayınlanan bir makalede D-pinitolün kakao tozunun tağşişinde işaretleyici olarak kullanılabileceğine dair küçük bir öneriye rastlanmıştır (Baumgartner vd 1986). Bilgilere ek olarak ülkemizde 1987 yılında yerel bir dergide kakao tozuna keçiyoynuzu tozunun ilave edilmesinin belirlenmesine yönelik bir makaleye rastlanmıştır (Altug ve Gönül 1987). Bu makalede ise sadece karbonhidrat analizi ile bu tağşişin belirlenmeye çalışıldığı ancak oransal olarak tağşişin boyutunun ortaya koyulamayacağı görülmektedir.

Yukarıda verilen bilgilerin dışında bu tip tağşişin belirlenmesine yönelik bu konuda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışılan tez konusu araştırma literatürdeki bu boşluğu dolduracak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada amaç piyasada satılan kakao tozlarına keçiyoynuzu tozunun ilave edilip edilmediğinin, ilave edildi ise yaklaşık hangi oranda olduğunun belirlenebileceği bir yöntemin geliştirilmesidir. Bu kapsamda keçiyoynuzunda doğal olarak bulunan D-pinitol adı verilen şeker alkolünün varlığının tespit edilmesi ile kakao tozuna keçiyoynuzu tozunun ilave edilmesi ile yapılan tağışın belirlenebilmesi ve böylece bu bileşiğin bir işaretleyci madde olarak kullanılması kurgulanmıştır.

2.4. Filtrasyon ve Durultma Yardımcı Maddeleri

Aktif kömür; bazı ağaç materyallerinin, kemiklerin veya sert çekirdekli meyvelerin çekirdeklerinin veya badem ve fındık gibi sert meyve kabuklarının öncelikle 600°C civarında sıcaklıklarda kömürleştirilmesi, ardından kontrollü olarak okside edilerek karbon dışındaki diğer bileşenlerin uzaklaştırılması ve kömürün aktif hale getirilmesi ile elde edilen granül veya toz haldeki bir adsorbendir. Ağırlığına göre çok geniş bir yüzey alanına ve buna bağlı olarak da yüksek bir adsorbsiyon gücüne sahiptir. Örnek olarak 1 adet aktif kömür tanesi yaklaşık 100 µm boyutundadır. Su veya berrak içeceklerde, istenmeyen renk veya koku olarak ortaya çıkmış olumsuz unsurların uzaklaştırılmasında kullanılır (Cemeroğlu 2009).

Aktif kömürüm iyon değiştirici özelliği yoktur. Sahip olduğu yüzey alanı sayesinde özellikle küçük boyutlu fenolik maddelerin, renk maddelerinin ve oksidasyon sonucu ortaya çıkan koku bileşenlerinin ortamdaki uzaklaştırılmaları konusunda etkili bir filtre yardımcı maddesidir (Morris and Main 1995).

Meyve suyu veya bazı ekstraktların üretiminde, az miktarda ve sürekli olmayan renk problemleri aktif kömürle aşılabilmektedir. Ancak üretimde sürekli renk açma sorunu ile karşılaşılıyor ise en doğru ve ekonomik çözüm polivinilpolipirrolidon (PVPP) kullanılmasıdır (Cemeroğlu 2009).

PVPP de aktif kömür gibi meyve suyu endüstrisinde filtrasyon yardımcı maddesi olarak ve aynı zamanda gıda numunelerinin analize hazırlanmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. PVPP, modifiye bir polietilen olup N-vinilpirrolidon'dan oluşmuş üç boyutlu ağ yapısına sahip sentetik bir polimerdir. Sahip olduğu yüksek molekül ağırlığı yapısı sayesinde su, asit, baz ve diğer bilinen organik çözücülerin hiçbirinde çözünmez. Asit ortamlarda fenolik ve polifenolik bileşen kompleksini ve düşük molekül ağırlıklı kateşinleri, moleküller arası hidrojen köprüleri oluşturarak absorbe etme özelliğine sahiptir (Cemeroğlu 2009, Morris and Main 1995).

Perlit, magmanın asit fazında oluşan lavların soğuyup, gözle veya mikroskopla görülebilecek bir yapıda kırılmasının meydana getirdiği, kütle bünyesinde su damlacıkları bulunan, camsı volkanik bir kaya ürünüdür. Bazı perlit tipleri kırıldığı zaman inci parlaklığında küçük küreler elde edildiğinden; perlit ismi inci anlamına gelen "Perle" kelimesinden türetilmiştir. Birçok mineral madde içerir. En çok SiO₂, Al₂O₃, Na₂O, K₂O içermektedir (Anonim 2016b). Ham perlit gözenekli yapıya sahiptir. 900 - 1100°C aralığında ısıtıldığında mısır tanesine benzer şekilde patlayarak orijinal hacminin 20 katı kadar genişletilmektedir. Bu patlama ve genleşme, yapısında % 2 - 4 civarında bulunan öz sudan kaynaklanmaktadır. Perlit sudan daha düşük yoğunluğa sahiptir, su üstünde yüzebilir. Bu da soğurma kapasitesini artırır. Kimyasal ve termal

reaksiyona girmez, çevreyi kirletmez. Katı veya sıvı karışımının içinde çözünmemiş maddeleri fiziksel olarak tutarak kolaylıkla ayrılmasını sağlar. Özellikle yağ sanayinde etkin biçimde kullanılmaktadır (Ergönül 2011).

Carrez durultması gıda sanayiinde şeker analizlerinden önce kullanılan adsorptif etki ile ortamdaki istenmeyen maddeleri uzaklaştıran bir uygulamadır. Uygulama iki adet farklı Carrez çözeltilerinin örneğe peşpeşe uygulanması şeklinde yapılmaktadır. Bu yöntemle durultmada Carrez çözeltileri ile ortamda çinko-hakzasiyanoferrat-II 'den oluşan hacimli kaba bir tortu meydana gelir. Bu tortu, ortamdaki azotlu organik bileşen ve yağ bazlı kolloidleri ve analizi etkileyecek diğer gereksiz unsurları absorbe eder ve filtrasyonda beraberinde götürür. Bu yolla berraklaştırmada neredeyse hiç şeker kaybı görülmektedir (Cemeroğlu 2010).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak Antalya ilinde faaliyet gösteren bir firmadan kavrulmuş ve öğütülmüş olarak temin edilen keçiboynuzu tozu ve D-pinitol içermediği analiz sonucunda belirlenen saf kakao tozu kullanılmıştır. Çalışmanın örnek hazırlama ve analiz geliştirme kısmı olan ilk kısım başarı ile tamamlandıktan sonra ülkemiz piyasasında satışa sunulan ticari 13 farklı kakao tozu örneği satın alınmış ve bu ürünler kakao tozu tağşişi araştırmasında kullanılmıştır. Filtrasyon ve durultma yardımcıları olarak ise Persa firmasından temin edilen perlit, Viniclar markalı PVPP, Merck'ten alınan Aktif Kömür ve Sigma Aldrich'ten alınan Carrez solüsyonları kullanılmıştır. Carrez için solüsyonlar toz halde alınmış her analiz öncesinde yeniden hazırlanmıştır.

3.1. Ön Denemeler

Yapılan ön denemelerde saf kakao tozu ve % 20 keçiboynuzu tozu içeren karışımın D-pinitol içerikleri karşılaştırılmıştır. Örnekler, analiz edilmek üzere suda çözüldürülmüş ve yaklaşık 400 kat seyreltilerek çalışmada kullanılmış olan D-pinitol tespitinde kullanılan yöntem ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları incelenerek D-pinitol içerikleri karşılaştırılmıştır.

3.2. Örnek Hazırlama Amacıyla Denenen Yöntemler

3.2.1. Örnek hazırlama denemelerinde kullanılmış olan tağşiş edilmiş karışımın hazırlanması

Örnek hazırlamada tüm uygulamaları birbiriyle karşılaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla keçiboynuzu tozu ile % 20 oranında tağşiş edilmiş olan kakao tozu kullanılmıştır. Bu amaçla 8 kısım kakao tozu 2 kısım keçiboynuzu tozu ile (toplam karışım maksimum 2 kg) 5 L kapasiteli ve kapanabilen cam bir bidon içerisinde karıştırılmış ve alt ve üste çevirmek suretiyle homojen bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım örnek hazırlama denemelerinde ana stok karışım materyali olarak kullanılmıştır. Üretilmiş olan ana stok karışımından 50 mL hacimli plastik santrifüj tüpüne 2 gram tartılıp üzerine 38 mL saf su ilave edilmiştir. Daha sonra karışımın iyice

çözündürülmesi için kapağı kapatılan tüp alt üst edilmiştir. Ekstraksiyonun tam manasıyla gerçekleştirilebilmesi amacıyla karışım 50°C'deki çalkalamalı su banyosunda 300 rpm karıştırma hızında 15 dakika süreyle karıştırılmıştır.

Bu şekilde hazırlanmış olan ekstrakt Seyreltik 1 (S1) olarak adlandırılmıştır. Çalışmada denenmiş olan tüm diğer örnek hazırlama yöntemleri bu aşamada elde edilen S1 isimli örnekle kıyaslanarak denenmiştir. Bu karşılaştırmanın kolaylıkla yapılabilmesi için bu aşamaya kadar 20 kat seyreltilen karışımdan 1 mL alınmış ve 19 mL saf su ile seyreltilmiştir (Toplamda 400 kat seyreltme). Daha sonra kaba filtre kâğıdından geçirilmesiyle elde edilen berrak kısım 0,45 µm çaplı membran filtre yardımıyla filtre edilmiş ve viallere alınarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen bu örnek ve kromatogram kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Tüm denemelerde örnekler S1 örneğinin farklı örnek hazırlama prosedürlerinden sonra toplamda 20 kat daha seyreltilmesi ile HPLC cihazına verildiği şekilde hazırlanmıştır. Böylelikle bu projede HPLC 'de analiz edilen tüm örnekler başlangıca göre 400 kat seyreltilmiştir.

3.2.2. Carrez durultması

Bu aşamada S1 örneklerine Carrez 1 ve Carrez 2 olarak bilinen ve gıdalarda genellikle yağ ve azotlu organik bileşenlerin ayrıştırılmasında kullanılan Carrez durultması uygulanmıştır. Carrez 1 ve Carrez 2 durultma çözeltileri aşağıda belirtilen prosedür kullanılarak hazırlanmıştır.

Carrez 1 çözeltisi: Bu amaçla saat camına potasyumhegzasiyanoferratrihidrat [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] kimyasalından 3,60 g tartılmış ve 100 mL hacimli ölçü balonuna huni yardımıyla saf su kullanılarak aktarılmıştır. Daha sonra çözündürme işlemi gerçekleştirildikten sonra saat camında kalan kimyasal saf su ile yıkanmış ve ölçü balonu hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Carrez 2 çözeltisi: Bu amaçla yine saat camına çinkosülfatheptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) kimyasalından 7,20 g tartılmış ve 100 mL hacimli ölçü balonuna huni yardımıyla saf su kullanılarak aktarılmıştır. Çözündürme işlemi gerçekleştirildikten sonra saat camında kalan kimyasal saf su ile yıkanmış ve ölçü balonu hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Her iki çözelti de kullanım anına kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Carrez durultmasında S1 örneğinden 50 mL hacimli ölçü balonuna 10 mL alınmıştır. Alınan örneğin üzerine ekstrakttaki kuru madde miktarının gram cinsinden kütle değerinin mililitre cinsinden 1/2'si, 1/1'i ve 2 katı olacak şekilde uygulamalar yapılmıştır (örneğin, ekstaktra çözündürülen kuru madde 2 gr ise 2 ml Carrez I ve II uygulanmıştır). Bu şekilde farklı miktarlarda uygulamaların ortaya çıkaracağı sonuçlar da gözlenerek en uygun uygulama miktarı seçilmiştir. Uygulamada 10 mL S1 üzerine Carrez 1 çözeltisi ilave edilerek nazikçe karıştırılmıştır. Belli bir süre beklendikten sonra Carrez 2 çözeltisi de ilave edilmiş ve yine nazikçe karıştırılmıştır ve ölçü balonu

hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır. Daha sonra karışım kaba filtre kâğıdından süzülmüştür. Elde edilen berrak kısımdan 1 kısım alınarak 3 kısım HPLC saflıktaki saf su ile karıştırılmış ve son olarak 0,45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilerek viallere alınmıştır. Buradan elde edilen örnekler “Ca” kodu ile kodlanarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.3. Aktif kömür uygulaması

Bu amaçla hazırlanan S1 örneklerinden 50 mL hacimli ölçü balonuna 10 mL alınmış ve literatürde kullanılan yaygın uygulamalara göre hesaplanarak en az 0,5 ve en fazla 20 g/L olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda aktif kömür uygulanmış, ölçü balonu hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanarak ve karıştırılmıştır. Gerekli adsorbsiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra karışım kaba filtre kâğıdından geçirilmiştir. Elde edilen berrak kısımdan 1 kısım alınmış 3 kısım HPLC saflıktaki saf su ile karıştırılmış ve 0,45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen örnekler “A” harfi ile kodlanarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.4. PVPP uygulaması

Bu amaçla hazırlanan S1 örneklerinden 50 mL hacimli ölçü balonuna 10 mL alınmış ve literatürde kullanılan yaygın uygulamalara göre hesaplanarak en az 0,5 ve en fazla 15 g/L olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda PVPP uygulanarak, ölçü balonu hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanıp karıştırılmıştır. Gerekli adsorbsiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra karışım kaba filtre kâğıdından geçirilmiştir. Elde edilen berrak kısımdan 1 kısım alınacak 3 kısım HPLC saflıktaki saf su ile karıştırılarak 0,45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen örnekler “PV” şeklinde kodlanarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.5. Perlit uygulaması

Bu amaçla da diğer iki uygulamada olduğu gibi hazırlanan S1 örneklerinden 50 mL hacimli ölçü balonuna 10 mL alınmış ve literatürde kullanılan yaygın uygulamalara göre hesaplanarak en az 0,5 ve en fazla 15 g/L olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda perlit uygulanmıştır. Perlit uygulanan ölçü balonu hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Gerekli adsorbsiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir. Sonrasında ise yine diğer uygulamalarda olduğu gibi, karışım kaba filtre kâğıdından geçirilerek elde edilen berrak kısımdan 1 kısım alınarak 3 kısım HPLC saflıktaki saf su ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 0,45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilerek elde edilen örnekler “P” harfi ile kodlanarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Yukarıda belirtilen dört uygulama bireysel olarak denenmiş ve elde edilen filtratlar HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Ancak buradan elde edilmiş sonucu desteklemek amacıyla, örnek hazırlama aşamaları esnasında numunedeki safsızlıkların yeterince ayrılıp ayrılmadığının belirlenmesinde örneklerin absorpsiyon değerlerinden de yararlanılmıştır. Bunun dışında her bir örnek hazırlama ajanının bireysel

uygulanmasının yanında her birisi için belirlenen optimum dozlar kullanılarak da ne kadar etkili bir örnek hazırlama prosedürünün hazırlanabileceği belirlenmiştir.

Başlangıç D-pinitol konsantrasyonunu değiştirmeden yani D-pinitol içeriğini azaltmadan en düşük absorbands ve en sade kromatogramı, veren uygulama en başarılı olarak kabul edilmiştir. Yukarıda belirtilen uygulamalarda seçilen dozlar bu filtre yardımcı maddelerinin meyve suyu endüstrisinde yaygın olarak kullanılan konsantrasyonlarıdır.

3.2.6. Filtre yardımcı maddeleri ve Carrez durultmasının bir arada uygulanması

Bu aşamada hazırlanan S1 örneklerine filtre yardımcıları ve durultma ajanlarının belirlenen konsantrasyonlarda bir arada uygulamaları tasarlanmıştır. Bu amaçla minimum, maksimum ve ortalama konsantrasyonları ön denemelerle belirlenen aktif kömür, perlit, PVPP ve Carrez uygulamaları S1 örneğine farklı konsantrasyonların kombinasyonu şeklinde uygulanmıştır.

Uygulama şekli ise diğer denemelerde olduğu gibi 50 mL hacimli ölçü balonuna 10 mL S1 ekstraktı alınarak denenecek miktarlarda filtre yardımcısı ve Carrez çözeltileri eklenmiş, belirli bir süre beklendikten sonra çözelti kaba filtre kâğıdından geçirilmiştir. Süzülmüş olan örneğin berrak kısmından bir kısım alınarak üzerine 3 kısım HPLC saflıkta su eklenip 45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilerek viallere alınmıştır. Kodlama yapılarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

3.3. Analiz Yöntemleri

3.3.1. Örneklerin D-pinitol ve karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

Başlangıçta numune olarak istenen saf kakao tozunda D-pinitol varlığının belirlenmesinde HPLC yöntemi kullanılmıştır (Tetik vd 2011).

Kromatografi koşulları

Cihaz (Shimadzu, LC 20A Serisi)

Dedektör ((Shimadzu, RID-10A refraktif indeks dedektör)

Dedektör hücre sıcaklığı: 60°C

Hareketli faz: Milli-Q su (izokratik), 0,6 mL/dakika

Analitik ve koruyucu kolon: Nucleogel 87P (300x7,8 mm ID, 20x4,0 mm ID)
(Transgenomic, Omaha, NE, USA)

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Kolon fırını sıcaklığı: 85°C

Burada kullanılmış olan kromatografik yöntem ile aynı elüsyonda serbest şekerler de ayrılabilirdiğinden bu analiz ile örneklerdeki serbest şeker içerikleri de belirlenmiştir. Ancak projenin temel amacı pürüzsüz kromatogramlar elde etmek olduğundan konsantrasyon belirlenmesine gitmeye gerek duyulmamıştır. Bunun yerine kıyaslamalar alanlar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Örneklerin absorbans değerlerinin belirlenmesi

Bu amaçla her aşamada hazırlanan örneklerde karotenoid testlerinde uygulandığı gibi spektrofotometrede 440 nm'de absorbans okumaları gerçekleştirilmiş ve örneklerdeki renk maddelerinin uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı absorbans değerleri kıyaslanarak belirlenebilmiştir.

Tüm bu yöntemler kullanılarak en uygun ve en iyi sonucu veren örnek hazırlama yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Optimum saflaştırma yöntemi belirlendikten sonra

saf kakao tozu ile keçiyoynuzu tozu farklı oranlarda (% 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oranlarında) karıştırılmış ve elde edilen son ürünün D-pinitol içeriği belirlenmiştir. Daha sonra ise keçiyoynuzu tozu ilave yüzdesi ile alınan D-pinitol alanları bir grafiğe yerleştirilmiş ve bir doğru elde edilmiştir. Elde edilen doğru ve denklem kullanılarak kakao tozuna yaklaşık hangi oranda keçiyoynuzu tozunun ilave edilmiş olabileceği rakamsal olarak ifade edilmiştir. Piyasadaki her keçiyoynuzu tozu aynı oranda D-pinitol içermeyeceğinden bu hesaplama ile tağışın hangi oranda yapıldığının yaklaşık olarak tespit edilebilmesi mümkün kılınmıştır. Daha sonra piyasadan alınan kakaolarda bu analiz gerçekleştirilerek örneklerdeki tağış durumu değerlendirilmiştir.

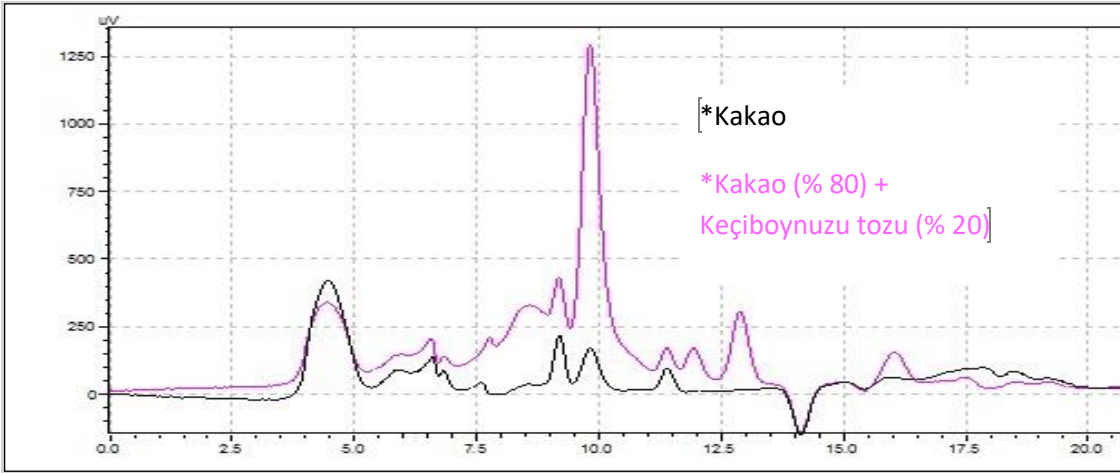
3.3.3. Azotlu organik bileşen miktarı analizi

Bu analiz ticari örneklere uygulanmıştır. Bunun sebebi ise kakao tozuna keçiyoynuzu tozu yanı sıra soya fasulyesi ununun da ilave edilebilme olasılığıdır. Ülkemizde soya ununun da pahalı olması nedeniyle bu tağışın görülme oranının bir hayli az olduğu düşünülse de küçük bir ihtimal de olsa ticari örnekleri soya fasulyesi unu tağışı yönünden de analiz etmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu amaçla Altug and Gonul (1988), tarafından tanımlanan tağış belirleme yönteminden faydalanılmıştır. İlgili çalışmada, kakao tozuna olası bir soya unu tağışını örneklerin azotlu organik bileşen miktarı içerikleri üzerinden belirlenebileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda ayrıca işaretleyici olarak kullandığımız D-pinitol'ün bir diğer kaynağının da soya ürünleri olduğu göz önüne alındığında, olası tağış için azotlu organik bileşen analizi iki farklı tağış maddesinden hangisinin uygulandığının da belirlemeye yardımcı olmuştur. Bu amaçla gıda numunelerinde sıkça uygulanan Kjedahl (Cemeroğlu 2010) yöntemine göre örneklerin azotlu organik bileşen içerikleri belirlenmiştir.

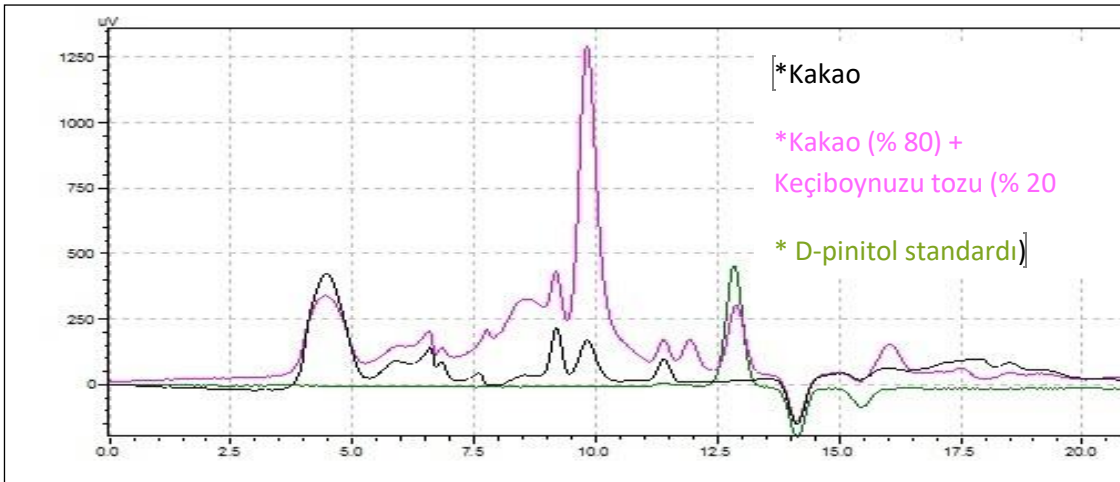
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Denemeler

Yapılan ön denemelerde saf kakao tozunun suda çözündürülmesi ve yaklaşık 400 kat seyreltilmesi ile elde edilen örnek D-pinitol tespitinde kullanılan bir yöntem ile analiz edilmiş ve D-pinitol'ün çıkış zamanında herhangi bir madde pikine rastlanmamıştır. Daha sonra % 20 keçiyoynuzu tozu içeren karışım yine aynı yöntemle hazırlanmış ve analiz edilmiş, elde edilen kromatogramda D-pinitol piki görülmüştür (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4. 1. Kakao tozu ve kakao tozu + Keçiyoynuzu tozu kromatogramlarının karşılaştırılması



Şekil 4. 2. Kakao tozu, kakao tozu + Keçiyoynuzu tozu ve saf D-pinitol'e ait kromatogramlarının karşılaştırılması

Kromatogramlarda 12,5. - 13. dakika arasında D-pinitol piki çıkmaktadır. Görüldüğü gibi siyah renkle belirtilen kakao tozuna ait kromatogramda aynı dakikada herhangi bir pik görülmemiştir. Kırmızı renkle belirtilen ve % 20 keçiboynuzu tozu ile tağış edilmiş kakao tozuna ait kromatogramda ise D-pinitolün yanı sıra çok fazla sayıda madde çıktığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda tespit edilen, yaklaşık olarak 10. dakikada çıkan maddenin sakaroz, 12. dakikada çıkan maddenin glukoz (D-pinitolden hemen önce) ve 16. dakikada çıkan maddenin ise fruktoz olduğu bilinmektedir. Elde edilen kromatogramlara göre bu şekerlerden sadece sakaroz hem kakao tozu da hem de keçiboynuzunda bulunmaktadır. Kırmızı renkli kromatogram incelendiğinde ise 11. dakikaya kadar çıkan maddeler kolonu aşırı yormakta ve böylece kolonun kullanım ömrü azalmaktadır.

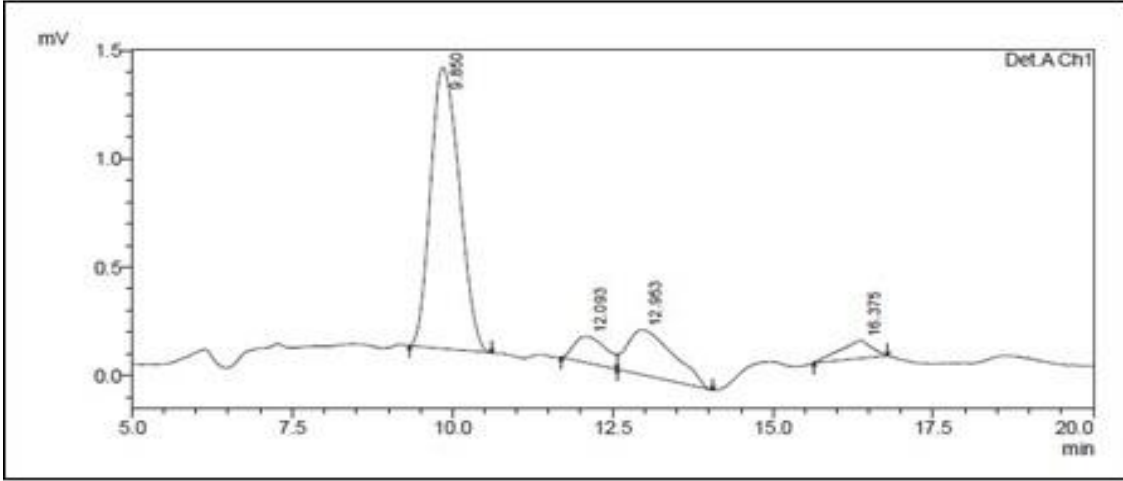
Ön denemeler sonucunda elde edilen kromatogramlar çalışmanın ikinci bir çıkış noktasını oluşturmuştur. Denemelerde 400 kat seyreltme oranında dahi elde edilen seyreltik çözeltinin halen kahverengi rengini koruduğu görülmüştür. Bu kahverengi renge sebep olan çeşitli renk maddelerinin ve hatta girişime sebep olabilecek olası çeşitli yağ ve azotlu organik bileşenlerin analiz öncesinde D-pinitol içeriğinin etkilenmeyeceği bir yöntem ile bertaraf edilmesi gerekliliği ön plana çıkmıştır. Bu gereklilik yerine getirildiğinde elde edilecek kromatogramın daha net ve kusursuz olacağı ve analizde kullanılan analitik kolonun kullanım ömrünün de daha uzun olacağı düşünülmüştür. Bu aşamada gıda maddelerinin analiz edilmelerinde özellikle yağ ve azotlu organik bileşenlerin uzaklaştırılmasında kullanılan Carrez durultmasının uygulanması planlanmıştır. Bunun yanında gıda örneklerinin analize hazırlanmalarında renk maddelerinin uzaklaştırılmasında kullanılan aktif karbon, fenoliklerin filtrasyonu amacıyla kullanılan PVPP ve fiziksel safsızlıkları yapısı ile absorbe eden perlit uygulamaları da D-pinitol içeriğini etkilemeyecek ancak diğer maddeleri ortamdan uzaklaştırabilecek filtrasyon yardımcısı olarak uygulanması düşünülmüştür.

4.2. Metot Geliştirme

Bu aşamada farklı filtrasyon yardımcı maddeleri ve Carrez durultması uygulamalarının S1 örneği üzerindeki etkileri gözlenmiştir.

4.2.1. Kontrol grubu olan S1 örneğinden elde edilen kromatogram

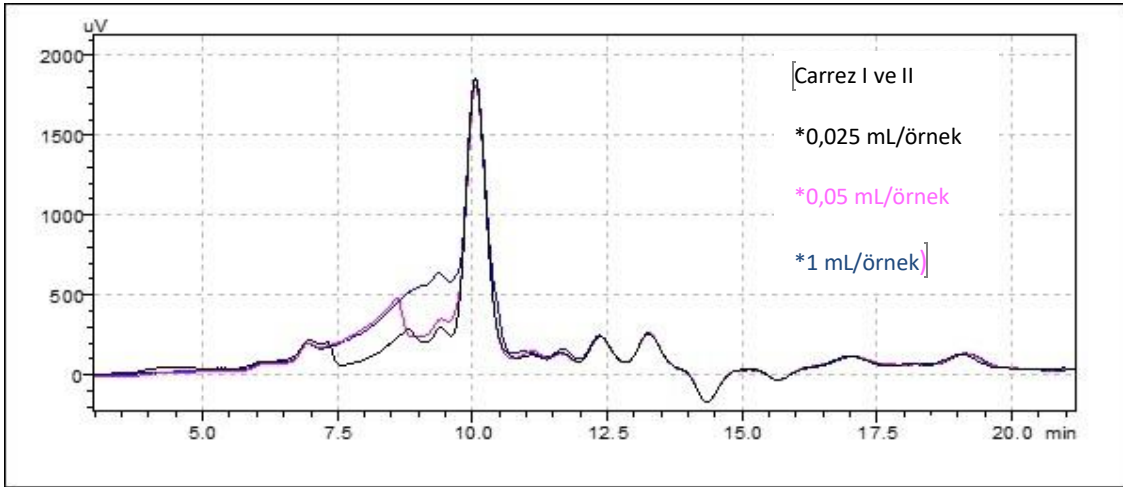
Denemede materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi % 20 oranında keçiboynuzu ile katkılanmış kakao tozu kullanılmıştır. Yine saf kakao ve saf keçiboynuzu tozunda olduğu gibi herhangi bir durultma veya filtrasyon uygulaması kullanılmadan Şekil 4.3'te gösterilen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 4. 3. S1 örneğinden kromatografik analiz sonucunda elde edilen kromatogram

4.2.2. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda Carrez durultması uygulanması ile elde edilen sonuçlar

S1 örneğine 0,025 mL, 0,5 mL ve 1 mL Carrez I ve Carrez II uygulanmış (minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyon) ve Şekil 4.4'te gösterilen kromatogram elde edilmiştir.

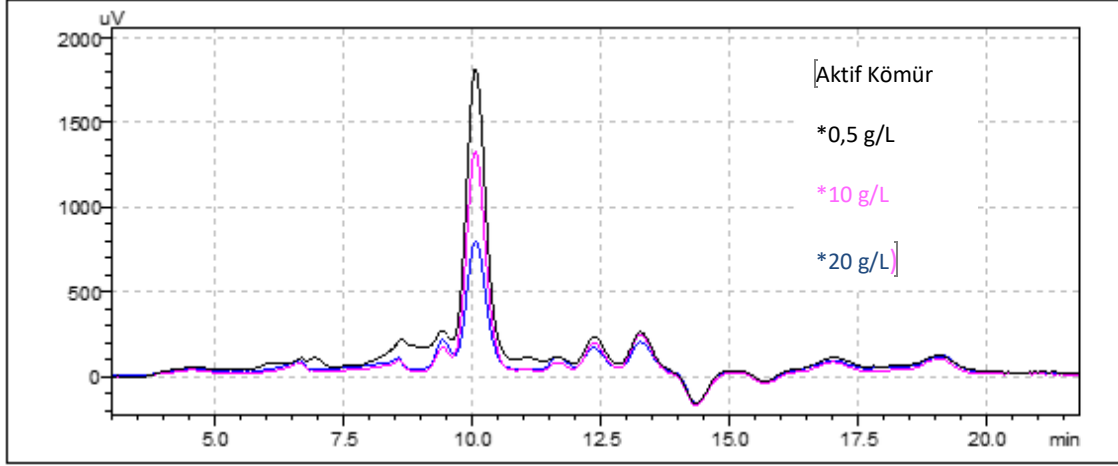


Şekil 4. 4. S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda uygulanan Carrez durultması ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 4.4'teki kromatogramlardan da görüleceği gibi artan Carrez konsantrasyonları özellikle elüsyonun 9. dakikasına kadar kromatogramda görülen safsızlıkların gelmesine neden olmaktadır. Ayrıca artan konsantrasyonda Carrez uygulamasının diğer safsızlıkları uzaklaştırmada etkisiz kaldığı görülmektedir. Bu nedenle en uygun kromatogramın Carrez uygulamasının minimum miktarda uygulandığı durumda elde edildiği belirlenmiştir.

4.2.3. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda aktif kömür uygulanması ile elde edilen sonuçlar

S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda aktif kömür uygulanmış ve sırasıyla minimum (0,5 g/L), ortalama (10 g/L) ve maksimum (20 g/L) konsantrasyonlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

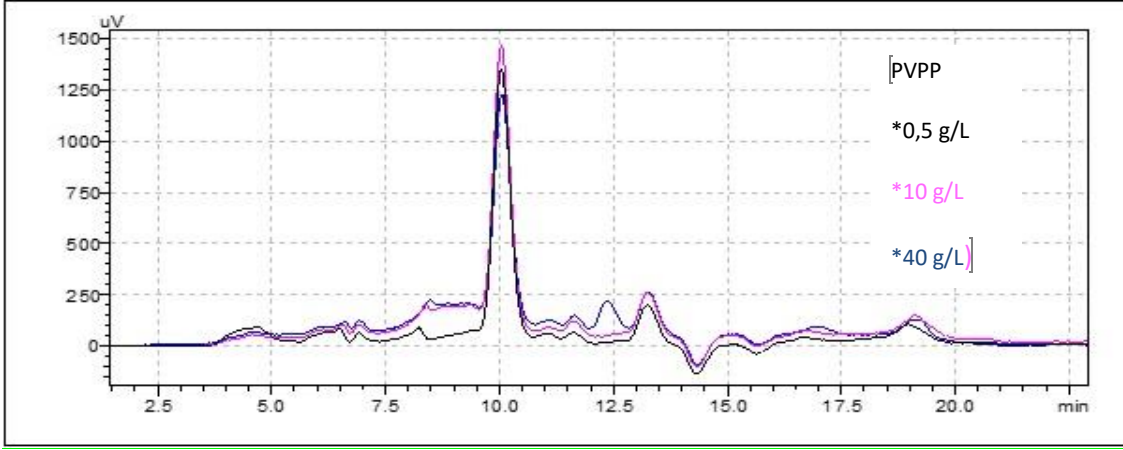


Şekil 4. 5. S1 örneğine farklı konsantrasyonda aktif kömür uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Artan aktif kömür uygulaması ile örnekteki sakaroz içeriği azalırken Carrez durultmasında olduğu gibi 9. saniyeden sonra farklı safsızlıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Ayrıca deneme sonuçlarında hilenin belirlenebilmesi için örneğin şeker kompozisyonunun gözlenmesi gerekmektedir. Artan aktif kömür konsantrasyonunun sakarozu ortamdan uzaklaştırmadaki etkisi, çalışma açısından istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle aktif kömür uygulamaları içinde de en uygun sonuç minimum konsantrasyonda (0,5 g/L) uygulanmasıdır.

4.2.4. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda PVPP uygulanması ile elde edilen sonuçlar

S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda PVPP uygulanmış minimum (0,5 g/L), ortalama (10 g/L) ve maksimum (40 g/L) konsantrasyonlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6'da verilmiştir.

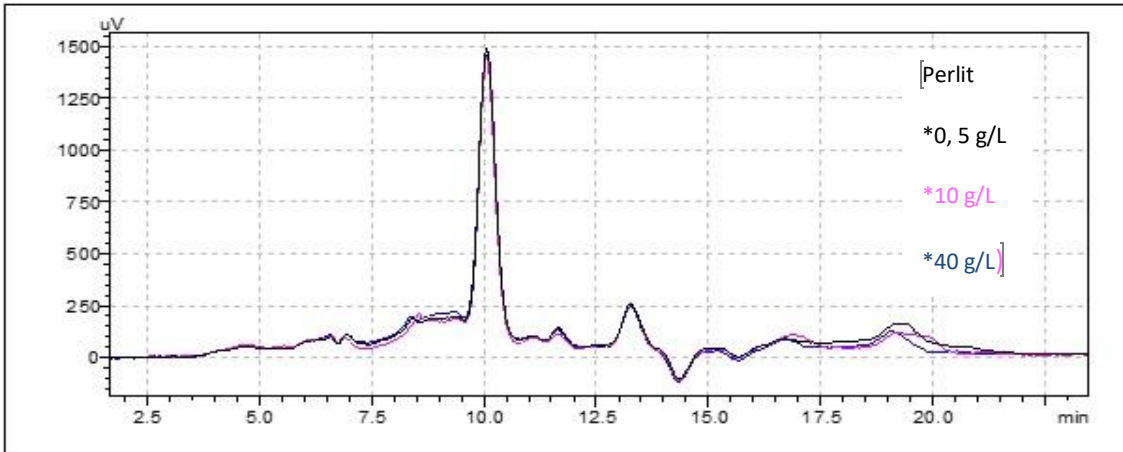


Şekil 4. 6. S1 örneğine farklı konsantrasyonda PVPP uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

PVPP uygulamasında konsantrasyon arttırıldığında örneklerin sakaroz ve glukoz içeriklerinde azalmalar gözlemlenmektedir. Denemelerde amaç özellikle şeker grubu bileşenlerden farklı olarak HPLC kolonumuzu yorabilecek ve kromatogramı bazal eksenenden uzaklaştırabilecek diğer safsızlıkların uzaklaştırılmasıdır. Bu bağlamda en uygun sonucun minimum konsantrasyonda (0,5 g/L) elde edildiği görülmektedir.

4.2.5. S1 örneğine minimum, ortalama ve maksimum konsantrasyonlarda perlit uygulanması ile elde edilen sonuçlar

S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda (0,5-40 g/L) konsantrasyonlarda perlit uygulanmış ve sırasıyla minimum (0,5 g/L) , ortalama (10 g/L) ve maksimum (40 g/L) konsantrasyonlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 7. S1 örneğine farklı konsantrasyonda perlit uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Kromatogramlar incelendiğinde perlit uygulamalarının S1 örneği üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulandığında dahi kayda değer bir etki gösteremediği ortaya

çıkıştır. Üç farklı konsantrasyondaki uygulamada da neredeyse birbirinin aynısı olan kromatogramlar şeklinde sonuçlar alınmıştır. Perlit uygulamasının konsantrasyon değeri dikkate alınmaksızın filtrasyonlarda etkisiz kaldığı görülmüştür.

4.2.6. S1 örneğine farklı filtrasyon ve durultma yöntemleri uygulanması sonucunda elde edilen örneklerin absorbens değerleri

S1'e yapılan filtrasyon ve durultma uygulamaları sonucunda elde edilen örneklerde belirlenen kromatogramların yanı sıra sıvı örneklerde 440 nm'de absorbens değerleri de belirlenmiştir. Çizelge 4.1.'de kakao tozu, keçiyoynuzu tozu ve S1 örneklerinin herhangi bir filtrasyon uygulaması tatbik edilmeden çözeltilerin 400 kat seyreltilmesi okunan değerler Çizelge 4.2.'de ise S1 örneğine yapılan filtrasyon ve durultma uygulamaları ile HPLC'ye verilen örneklerin 440 nm'de absorbens değerleri verilmiştir.

Sonuçlardan da görüleceği gibi kakao daha yüksek bir absorbens değeri verirken keçiyoynuzu tozu ise daha düşük bir absorbens değeri vermektedir.

Çizelge 4.1. Örnek çözeltilerinin 400 kat seyreltikten sonraki absorbens değerleri

	Kakao Tozu	Keçiyoynuzu Tozu	S1
440 nm'de absorbens	0,299	0,039	0,180

Çizelge 4.2. S1'e yapılan uygulamalar ile elde edilen örneklerin absorbens değerleri

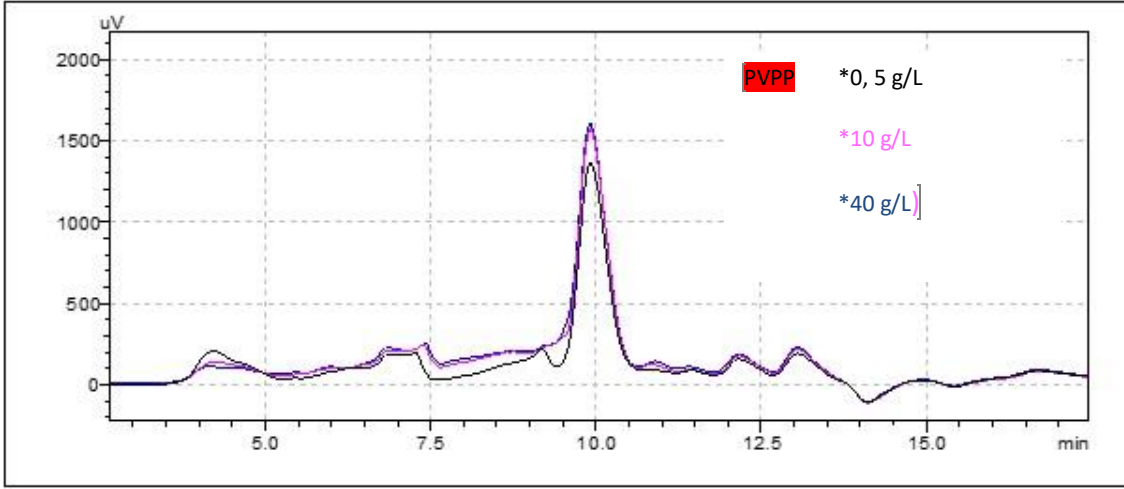
	Minimum konsantrasyon	Ortalama konsantrasyon	Maksimum konsantrasyon
Carrez	0,198	0,164	0,114
Aktif kömür	0,181	0,156	0,095
PVPP	0,161	0,108	0,072
Perlit	0,197	0,186	0,173

Farklı filtrasyon yardımcı maddeleri ve Carrez durultmasının farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ortaya çıkardığı kromatogramlar ve hazırlanan örneklerde belirlenen absorbens değerleri birlikte değerlendirildiğinde Carrez, aktif kömür, PVPP uygulamalarının etkili olduğu ancak perlit uygulamasının etkisiz kaldığı görülmüştür.

4.3. Farklı Filtrasyon ve Durultma Uygulamalarının Kombinasyonları ile Elde Edilen Bulgular

S1 örneğine farklı konsantrasyonlarda (0,5-40 g/L) konsantrasyonlarda aktif kömür, PVPP, perlit ile filtrasyon ve Carrez durultması kombine şekilde, farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

4.3.1. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Carrez ve Aktif kömür, artan konsantrasyonlarda PVPP uygulanması ile elde edilen bulgular



Şekil 4. 8. S1 örneğine minimum konsantrasyonda Carrez (0,025 mL/örnek), aktif kömür (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda (0,5 g/L, 10 g/L, 40 g/L) PVPP uygulanması ile elde edilen kromatogram

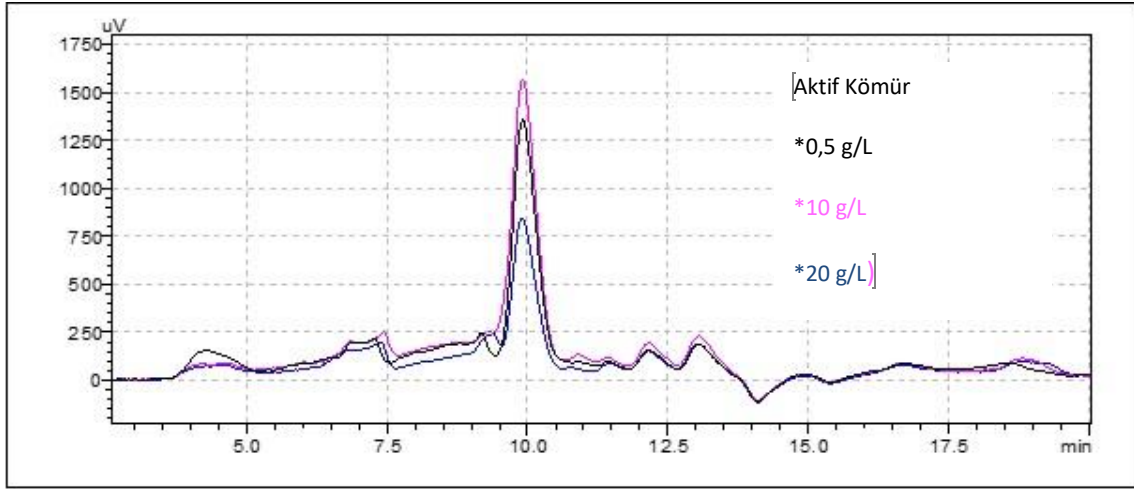
Carrez ve aktif kömür uygulamalarının minimum konsantrasyonlarda sabit tutulup, PVPP uygulamasının kademeli olarak arttırıldığı üç farklı deneme sonucunda artan PVPP konsantrasyonunun ortamdaki sakarozu uzaklaştırmada etkili olduğu gözlemlenmiştir. Denemelerde amaç, örneği şeker grubu dışındaki bileşenlerden arındırarak kolona girişim yapan madde çeşitliliğini azaltmak ve kromatografi kolonunu daha az yoracak hale getirmektir. Böylece şeker analizlerimizde bazal eksen üzerinde sadece şeker kompozisyonunun tayin edilebildiği daha sade bir kromatogram elde edilmesi mümkün olacak, şeker analizi yapılan ve maliyetli bir gereç olan kromatografi kolonun daha fazla analizde kullanılabilmesi sağlanacaktır.

Diğer filtrasyon ve durultma ajanları sabit tutularak PVPP konsantrasyonunun artışı, ortamdaki şeker dışındaki safsızlıkları uzaklaştırmada etkin bir sonuç ortaya çıkaramamış, ayrıca şeker dışındaki bileşenleri gösteren piklerin alanları her konsantrasyon artışında bir önceki denemeye göre artmıştır. Tüm bu etmenler göz önünde bulundurulduğunda filtrasyon amacı ile uygulanan PVPP konsantrasyonunun artışı kromatografi için olumsuz sonuç göstermiştir (Şekil 4.8). Örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sabit Carrez ve Aktif kömür konsantrasyonlarında artan PVPP konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbans değerleri

Uygulanan PVPP konsantrasyonu	0,5 g/L	10 g/L	40 g/L
440 nm'de absorbans	0,227	0,224	0,159

4.3.2. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Carrez ve PVPP, artan konsantrasyonlarda Aktif kömür uygulanması ile elde edilen bulgular



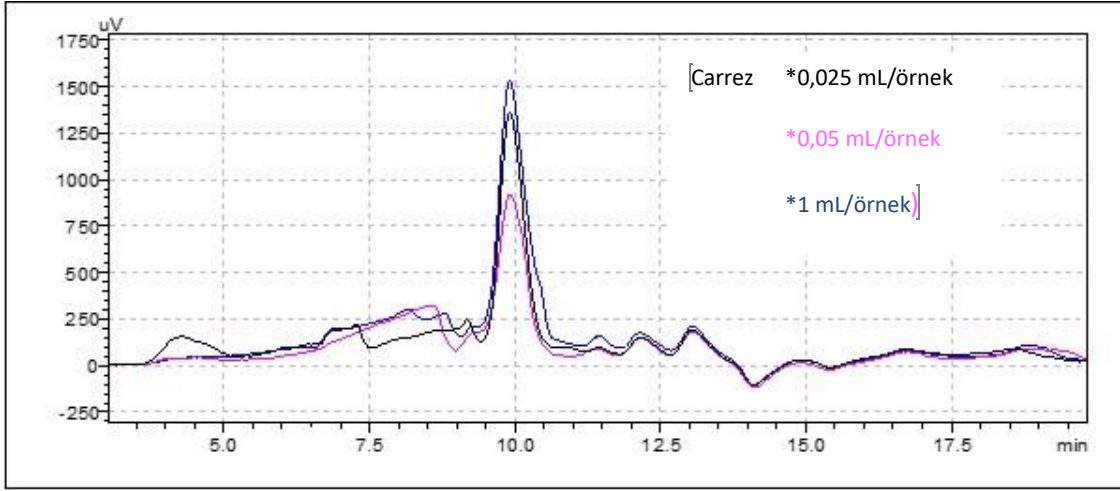
Şekil 4. 9. S1 örneğine minimum konsantrasyonda Carrez (0,025 g/örnek), PVPP (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda (0,5 g/L, 10 g/L, 20 g/L) aktif kömür uygulanması ile elde edilen kromatogram

Carrez ve PVPP uygulamalarının sabit konsantrasyonda tutulup, aktif kömürün artan konsantrasyonlarda uygulanmalarında 10 g/L konsantrasyonda olan uygulamanın daha altı ve üzerindeki konsantrasyonlarda ortamdaki şeker miktarında bir miktar azalma görülmüştür. Bu da aktif kömürün artan konsantrasyonlarda uygulamalarında diğer durultma ve filtrasyon ajanları ile etkileşime girerek çalışmamız açısından olumsuz bir etki ortaya çıkardığını göstermektedir. Ayrıca artan konsantrasyonlarda uygulandığında mevcut durumda olamayan bileşenler ortaya çıkmaktadır. Uygulanan filtrasyon ve durultma uygulamalarında amaç, şeker grubu bileşenlerin analizinin yapıldığı kromatografi kolonuna şeker ve şeker alkoller dışındaki bileşenlerin girişimlerini önlemek, kolona enjekte etmeden önce ortamdan uzaklaştırabilmektir. Böylece bazal eksene daha yakın, sade ve kolay yorumlanabilir sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır. Artan aktif kömür konsantrasyonu çalışmamız amaçlarına uygun bir sonuç ortaya çıkaramamıştır (Şekil 4.9). Örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Sabit Carrez ve PVPP konsantrasyonlarında artan Aktif kömür konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbans değerleri

Uygulanan Aktif kömür konsantrasyonu	0,5 g/L	10 g/L	20 g/L
440 nm'de absorbans	0,227	0,261	0,240

4.3.3. S1 örneğine sabit konsantrasyonda Aktif kömür ve PVPP, artan konsantrasyonlarda Carrez uygulanması ile elde edilen bulgular

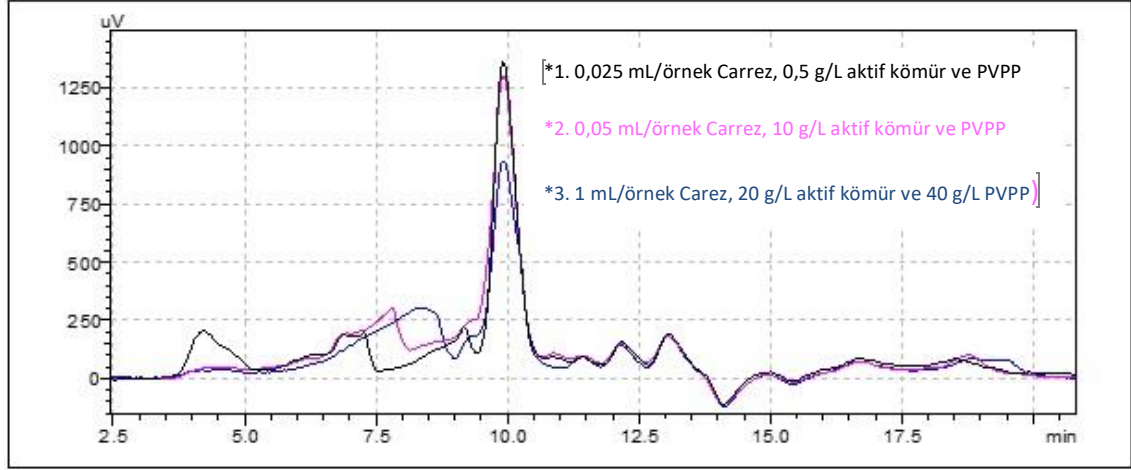


Şekil 4. 3. S1 örneğine minimum konsantrasyonda aktif kömür (0,5 g/L), PVPP (0,5 g/L) ve artan konsantrasyonlarda Carrez (0,025 mL/örnek, 0,05 mL/örnek, 1 mL/örnek) uygulanması ile elde edilen kromatogram

Aktif kömür ve PVPP uygulamalarının konsantrasyonu sabit tutulup Carrez uygulamasının konsantrasyonunun kademeli olarak arttırıldığı durumlarda da Carrez çözeltileri ortamdan sakkarozun uzaklaştırılmasında etkili olmuşsa da artan konsantrasyonlarda hem etkisi azalmış hem de kromatogramda farklı girişimler gözlenmiştir. Uygulama konsantrasyonu tekrar arttırıldığında ise sakkarozu uzaklaştırmadaki etkisi azalmıştır. Bununla beraber yine 0,05 mL/örnek konsantrasyonunda uygulamada, 5,5. saniyeden 9. saniyeye kadar olan zamanda kolonda girişime sebep olan diğer maddelerin miktarında artış gözlenmiştir. Bu sebeple Carrez çözeltilerinin de, diğer filtrasyon yardımcıları ile etkileşime girdiği ortaya çıkmaktadır. Artan Carrez konsantrasyonun diğer çözeltilerle etkileşime girmesi ve etkileşim sonucu ortaya çıkardığı kromatogram, bu durumun olumsuz etkisini göstermektedir. 1 mL/örnek Carrez kullanılması, 0,025 mL/örnek kullanıldığı duruma göre hem ortamdan şekerler grubu bileşenleri uzaklaştırmakta hem de kolonda istenmeyen maddelerin girişimine sebep olmaktadır (Şekil 4.10). Örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

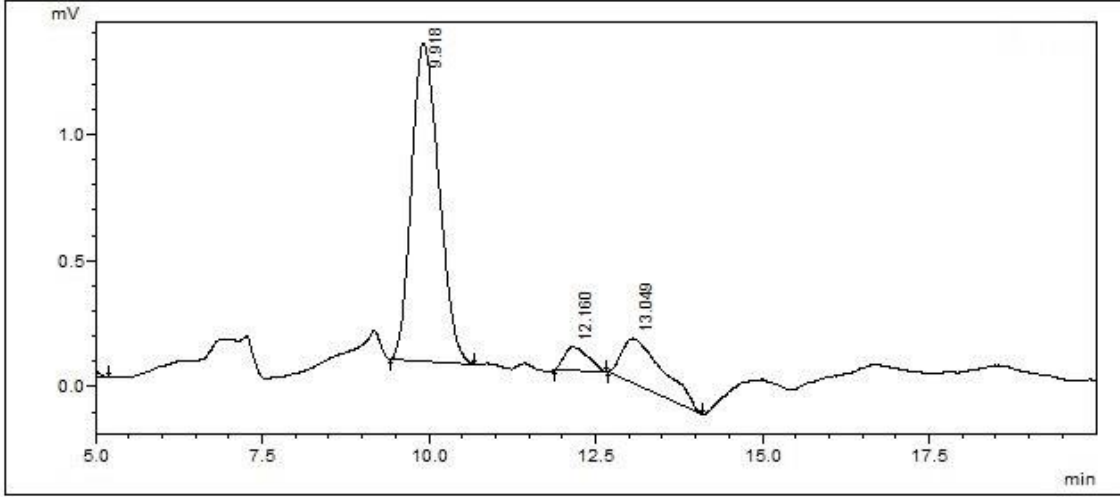
Çizelge 4.5. Sabit Aktif kömür ve PVPP konsantrasyonlarında artan Carrez konsantrasyonu ile elde edilen örneklerin 440 nm'de absorbans değerleri

Uygulanan Aktif kömür konsantrasyonu	0,5 g/L	10 g/L	20 g/L
440 nm'de absorbans	0,227	0,449	0,359



Şekil 4. 4. S1 örneğine artan konsantrasyonda aktif kömür, PVPP ve Carrez uygulanması ile elde edilen kromatogram

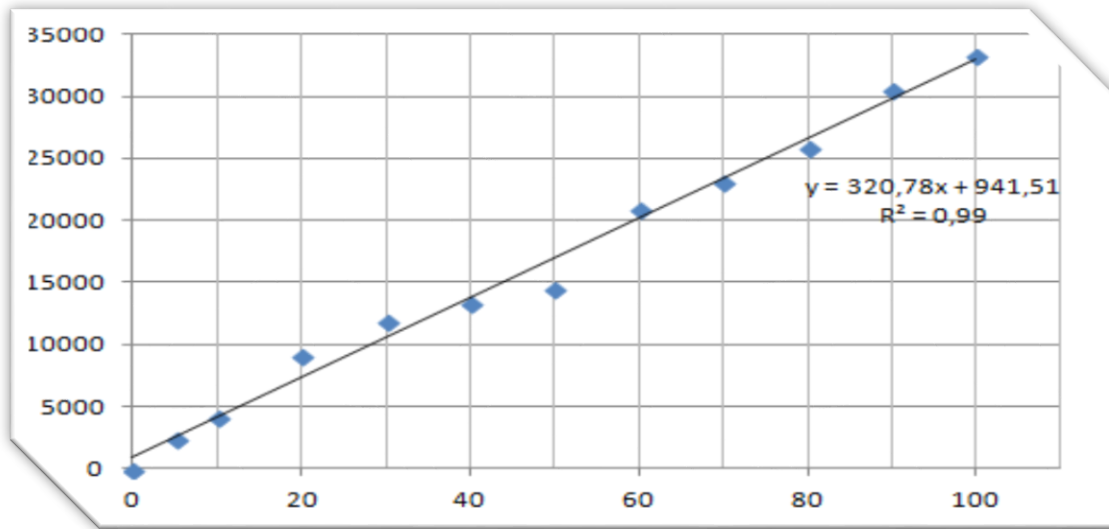
S1 örneğine uygulanan filtrasyon yardımcıları ve durultma ajanları 1. kromatogramda her biri en az olarak sabitlenen, 2. kromatogramda herbiri ortalama olarak sabitlenen, 3. kromatogramda ise her biri maksimum olarak sabitlenen konsantrasyonda ve bir arada uygulanmıştır. Birinci, ikinci ve üçüncü kromatogramlar aynı anda incelendiğinde artan konsantrasyonlarda yapılan uygulamalar, ortamdaki şeker içeriğini değiştirmekle beraber farklı maddelerin kolona girişine ve okumaya sebep olmuştur (Şekil 4.11). Çalışmadaki amacımız dikkate alındığında ortamdaki şeker içeriği ve D-pinitol'ün kolay tanımlanabilmesi için girişim yapan diğer maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle her bir filtrasyon yardımcısı ve durultma ajanının bir arada ve minimum konsantrasyonda (0,025 mL/örnek Carrez, 0,5 g/L aktif kömür ve 0,5 g/L PVPP) uygulanması en etkin örnek hazırlama yöntemi olarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında farklı oranlarda tağşiş yapılan örnekler minimum konsantrasyonda filtrasyon ve durultma uygulamaları ile analize hazırlanmıştır. Bu bağlamda S1 örneğine tercih edilen konsantrasyonlarda ve birarada yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.12.'de en sade şekli ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 5 S1 örneğine minimum konsantrasyonda aktif kömür (0,5 g/L), PVPP (0,5 g/L) ve Carrez (0,025 mL/örnek) uygulanması ile elde edilen kromatogram

4.4. Tağış Oranını Belirleyecek Standart Denklemin Eldesi

Bu amaçla saf kakao tozundan başlayarak kakao tozunu % 5, % 10, % 20, % 30, % 40, % 50, % 60, % 70, % 80, % 90 oranlarında keçiyoynuzu ile tağış ederek ve % 100 keçiyoynuzu dahil 12 örnek, seçilen konsantrasyonlarda filtrasyon yardımcıları ve durultma ajanları ile analize hazırlanıp HPLC sistemine enjekte edilmiştir. % 100 kakao tozu ve % 100 keçiyoynuzu tozu arasındaki numunelerin vermiş oldukları D-pinitol piki alanları Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Bu alanlar alınırken alanların doğruluğu için manuel integrasyon yapılarak D-pinitol pikinde doğrulamaya gidilmiştir.



Şekil 4. 6. Farklı oranlarda keçiyoynuzu ile tağış edilen kakao tozu örneklerinin D-pinitol alanları

Şekil 4.13'te de görüldüğü gibi, karışımdaki keçiyoynuzu tozu oranının artması ile elde edilen D-pinitol alanında da beklenen artış görülmektedir. Oranlara göre belirlenen D-pinitol alanları grafiğe işlenerek yukarıdaki doğru elde edilmiştir. Eğer herhangi bir kakao tozuna keçiyoynuzu tozu ilavesi yapılmış ise bu projedeki örnek hazırlama ve analiz yöntemi kullanılarak belirlenecek D-pinitol alanı yukarıdaki grafikte gösterilen doğrunun denkleminde y değişkeninin yerine konulduğunda hesaplanacak olan x değeri o örneğe yaklaşık olarak yüzde kaç oranında keçiyoynuzu tozu ilavesi yapıldığını gösterecektir. Bunun için % 99 doğrulukta $y=320,78x+941,51$ şeklinde bir denklem ile matematiksel model geliştirilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta şudur ki, bu durum bu çalışmada kullanılan keçiyoynuzu tozunun D-pinitol içeriği ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla elde edilecek sonuç kesin sonuç değil yaklaşık bir sonuçtur.

4.5. Piyasadan Satın Alınan Ticari Kakao Tozu Örneklerinde, Çalışmada Geliştirilen Yöntem ile D-pinitol Belirlenmesi

Piyasada ticari olarak satılan 13 farklı kakao tozu örneği, saf kakao tozu ve keçiyoynuzu tozu analize tabi tutulmuştur. Analizde örnekler D-pinitol yönünden incelenmiştir. Yapılan kromatografik analiz sonucunda örneklerin hiçbirinde D-pinitol içeriğine rastlanmamıştır. D-pinitol'ün beklendiği 13. dakikada herhangi bir pik gözlemlenmemiştir. Bir başka ifade ile piyasadan tedarik edilen kakao tozu örnekleri keçiyoynuzu tozu ilavesi yönünden emindir ve bu örneklerde herhangi bir keçiyoynuzu tozu ilavesi yapılmadığı belirlenmiştir. Yukarıdaki şekilden de görüleceği gibi % 5 keçiyoynuzu tozu ilavesinde bile taşış belirlenebilmekte, bu oran % 1 dolayında olsa bile kromatogramda D-pinitol piki görülebilmektedir.

Ticari örneklerde D-pinitol bulunamaması bu proje ile tanımlanan örnek hazırlama ve analiz yönteminin geçerli olmadığı anlamına gelmemektedir. Yalnızca örnekleme sonucunda alınan örneklerde bu taşış rastlanmamıştır.

4.6. Piyasadan Satın Alınan Ticari Kakao Tozu Örneklerinin Azotlu Organik Bileşen İçerikleri

Ticari kakao tozu örneklerinde D-pinitol tespit edilmesi durumunda, tespit edilen işaretleyiciye soya unun sebep olması ihtimaline karşı, ticari örneklerde azotlu organik bileşen miktarlarının tespit edilmesi düşünülmüştür. Her ne kadar ticari kakao örneklerinde D-pinitol belirlenmemiş olsa da fikir vermesi açısından çalışmada kullanılan ve saflığından emin olunan kakao tozu örneğinde (Örnek no:1) piyasadan satın alınan diğer kakao örneklerinde (Örnek no:2-14) ve keçiyoynuzu tozunda (Örnek no:15) azotlu organik bileşen tayini de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6. Piyasadan satın alınan kakao tozu örneklerinin (Örnek no:2-14) ve keçiyoynuzu tozunun (Örnek no:15) azotlu organik bileşen içerikleri

Örnek no	Azotlu organik bileşen miktarı (%)
1	24,3
2	18,65
3	21,00
4	22,9
5	21,95
6	23,78
7	21,97
8	24,28
9	23,98
10	23,28
11	22,62
12	23,83
13	22,49
14	11,36
15	3,8

Çizelge 4.6 incelendiğinde 15 numaralı örneğin azotlu organik bileşen miktarı diğerlerinden farklıdır. Bunun sebebi ise bu örneğin sadece keçiyoynuzu tozu içermesidir. Görüleceği gibi keçiyoynuzu tozunun azotlu organik bileşen içeriği %3,8'dir. 1 numaralı örnek ise bu araştırmada kullanılan ve standart kabul edilen saf kakao örneğidir. Bu örneğin azotlu organik bileşen miktarı ise % 24,3'tür. 2 - 14 numaralı örnekler ise piyasadan satın alınan kakao tozu örnekleridir. Bu örneklerin azotlu organik bileşen içerikleri % 11,36 - 23,98 aralığındadır. Ancak bireysel olarak değerlendirildiğinde 14 numaralı örnek diğer 12 adet ticari örnekten azotlu organik bileşen yönünden farklıdır. Diğer örneklerde azotlu organik bileşen miktarlarında yığılma yaklaşık olarak % 22 dolaylarında iken bu örnekte bu oran yaklaşık olarak bunun yarısıdır. Bir başka ifade ile 14 numaralı örnek ticari kakao örneklerinden azotlu organik bileşen yönünden ayrılmaktadır. Bu örneğe tespit edilmeyen başka bir tağşiş yapıldığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışma ile kakao tozuna keçiyoynuzu tağışışının belirlenmesi amacıyla bir kromatografik yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla gıda sanayinde sıklıkla kullanılan Carrez çözeltileri, aktif kömür, PVPP ve perlit gibi durultma ve filtrasyon materyallerinin farklı konsantrasyonları her madde için ayrı ayrı denenmekle kalmamış bu maddelerin farklı konsantrasyonları diğer maddelerin farklı konsantrasyonları ile kombine bir şekilde denenmiştir. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda en uygun örnek hazırlama yöntemi olarak seyreltik örneğe 0,05 mL Carrez I ve 0,05 mL Carrez II çözeltilerinin uygulanmasını takiben 0,5 g/L aktif kömür ve bunu takiben 0,5 g/L PVPP uygulanması ve daha sonra sıvı örneğin 0,45 µm membran filtreden geçirilerek HPLC sistemine enjekte edilmesi bulunmuştur. Örnek hazırlama esnasında aktif kömürün artan konsantrasyonlarda kullanılması ile başta sakaroz olmak üzere diğer şekerlerin konsantrasyonlarında azalmaların da olduğu görülmüştür. Eğer geliştirilen yöntemde D-pinitolün yanı sıra şekerler kompozisyonunun da görülmesi amaçlanmış olmasaydı aktif kömürün artan konsantrasyonlarının da kullanılabileceği belirlenmiştir. Bunun yanında örnek hazırlama denemelerinde perlitin tek başına ve diğer filtrasyon yardımcı maddeleri ile kombine kullanımının etkili olmadığı gözlenmiştir. Hatta bazı durumlarda farklı safsızlıklar da ortaya çıkmıştır.

Denemeler sonucunda geliştirilen analiz ve hesaplama yöntemi ile kakao tozuna keçiyoynuzu tozu katılama yoluyla yapılabilecek olası tağışışı, karışım oranı % 5'ten fazla ise güvenli bir şekilde belirlemenin mümkün olduğu saptanmıştır. Katılama oranının % 5'ten çok daha az olduğu durumlarda dahi olası tağışışleri yüksek bir doğrulukla tahmin etmenin kolay olduğu da görülmüştür.

Çalışmada ticari kakao tozuna olası yapılabilecek veya yapıldığı tahmin edilen keçiyoynuzu tozu tağışışı çıkış noktası olmuş, bu çıkış noktasından itibaren kakao tozu içeriğinde bulunmayan ancak keçiyoynuzu tozu içeriğinde bulunan D-pinitol işaretleyici madde olarak kullanılmıştır. Bu bağlamda tüm çalışma D-pinitol üzerinden devam etmiştir. Olası tağışış durumunda eğer keçiyoynuzu tozu kullanıldıysa çalışma verilerindeki en uygun filtrasyon ve durultma konsantrasyonları ve HPLC koşulları dikkate alınarak tek analiz ile kakao örneği içerisindeki kakao tozu miktarı oransal olarak tespit edilebilecek bir denklem elde edilmiştir. Ancak bu konuda dikkate alınması gereken diğer bir husus ise çalışma çıktılarının keçiyoynuzu tozundan farklı olarak D-pinitol içeriği olan diğer benzer maddeler ile yapılacak olası tağışışlerde kesin veya doğru tağışış oranlarını vermeyeceği ihtimalidir. Bu ihtimal doğrultusunda da yine çalışma çıktıları kullanılarak, tağışış yapıldığı tahmin edilen örneğin D-pinitol içeriği bulunduktan sonra mevcut denklemde hesaplamaları yapılarak yakın sonuçlar elde edilebileceği göz ardı edilmemelidir.

D-pinitol içeriği belirlenen kakao örneklerinde, D-pinitol kaynağının belirlenmesi amacı ile azotlu organik bileşen tayini yapılmıştır. Bunun sebebi ise piyasada D-pinitol içeren, kakaoya renk ve tekstürel yapı olarak yakın, aromatik olarak da benzer veya kakaoya göre daha az baskın olan ve keçiyoynuzu tozu gibi kakaodan ucuz ve kolay ulaşılabilir bir hammadde olan soya fasulyesi unu katılama ihtimalidir. Soya fasulyesi unu, bileşiminde bulunan yaklaşık % 50 azotlu organik bileşen ile keçiyoynuzu tozu ve kakao tozuna göre daha yüksek oranda azotlu organik bileşen

içermektedir (Nilüfer 2007). Araştırmanın amacı keçiboynuzu tozu tağışışını oransal olarak belirlemek olduğu için olası soya unu katkılama durumunu belirlemeye yönelik farklı bir çalışma yapılmamıştır. Çalışma ile belirlenen analiz yöntemi kullanılarak ticari kakao tozu örneklerinde keçiboynuzu tağışışı olup olmadığını belirlemeye yönelik analizler yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda ticari örneklerde keçiboynuzu tağışışına rastlanmamıştır ancak olası farklı bir tağışışın belirlenebileceği düşüncesi ile örneklerde azotlu organik bileşen tayini yapılmıştır. Azotlu organik bileşen tayini sonuçlarına bakıldığında 13 ticari örnekten bir tanesinin diğer 12 örnekten çok farklı olduğu görülmüştür. Azotlu organik bileşen miktarının beklenenin neredeyse yarısı olması sebebiyle bu örnekte keçiboynuzu ve soya unu tağışışı dışında farklı bir hilenin olabileceği düşünülmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalar farklı metotlar kullanılarak uygulandığından, literatürde karşılaştırma yapılabilecek farklı bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle benzer çalışmalar ile karşılaştırma yapılamamıştır. Araştırmanın, bu özelliği ile de literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak kakao tozu örneklerine olası keçiboynuzu tağışışının oransal olarak belirlenmesinde kullanılacak bir örnek hazırlama yöntemi belirlenmiştir ve bu yöntemle hazırlanan örneklere kromatografik analiz yapılmıştır. Verilerin hesaplanarak sonuca ulaşılabileceği bir denklem tanımlanmış; standart bir metot ile muhtemel bir tağışışın belirlenmesi kolaylaştırılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- ALBRIGHT, F.R., SCHUMACHER, D.V. and MAJOR, R.A. 1978. Detection of Carob in Cocoa Powder. *Manuf Confect*, 58(5): 37-39.
- ALTUĞ, T. and GÖNÜL, M. 1987. Toz kakaonun keçiyoynuzu unu ile tağışışinin saptanması üzerine bir çalışma. *Gıda Sanayii*, 1: 37-39.
- ALTUĞ, T. and GONUL, M. 1988. The Detection of Soybean Flour in Cocoa Powder. *J Food Quality*, 10(5): 295-298.
- ANONİM 1977. TS 2907 Keçiyoynuzu (Harnup). *TSE*. Ankara.
- ANONYMOUS 1987. Carob Specification. International Organization for Standardization. *International Standard*. 1987; ISO 7907: 4 s.
- ANONİM 2010. 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, *Gıda Ve Yem Kanunu*
- ANONİM 2012. Kakao ve kakao ürünleri tebliği.
- ANONİM 2015. FAO, faostat.fao.org [Son eriřim tarihi 25.12.2015]
- ANONİM 2016. bitkiselansiklopedi.blogspot.com.tr/2013/11/kakaovefaydaları [Son erişim tarihi 01.02.2016]
- ANONİM 2016a. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kakao> [Son eriřim tarihi 03.03.2016]
- ANONİM 2016b. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Perlit> [Son eriřim tarihi 05.04.2016]
- AVALLONE, R., PLESSİ, M., BARALDİ, M. and MONZANİ, A. 1997. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua L.*): Protein, Fat, Carbohydrates and Tannins. *J Food Comp Anal*, 166-172.
- AYAZ, F. A., TORUN, H., AYAZ, S., CRREIA, P. J., ALAIZ, M., SANZ, C., GRUZ, J. and STRNAD, M. 2007. Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua L.*): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30, : 1040-1055.
- BAREL, M., LEON, D. and VINCENT, J. C. 1985. Influence of cocoa fermentation time on the production of pyrazines in chocolate. *The Cafe Cacao*, 4, 277-286.
- BARRACOSA, P., OSORIO, J. and CRAVADOR, A. 2007. Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua L.*) cultivars in Algarve Region, *Scientia Horticulturae*, 114: 250-257.

- BAUMGARTNER, S., GENNERRITZMANN, R., HAAS, J., AMADO, R. and NEUKOM, H. 1986. Isolation and Identification of Cyclitols in Carob Pods (*Ceratonia Siliqua L.*). *J Agric Food Chem*, 34(5): 827-829.
- BECKETT, S. T. 2009. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, fourth edition, Oxford, United Kingdom, 76 – 142 s.
- BERBERT, P.R.F. 1979. Contribution to the knowledge of sugars components of almond and cocoa liqueur. *Rev. Theobroma. Brazil*, 9, 55-61.
- BERNA, A., PEREZ GAGO, M.B., GUARDIOLA, V.G., SALAZAR, D. and MULET, A. 1997. Effect of temperature on isobutyric acid loss during roasting of carob kibble, *J Agric Food Chem*, 45(10): 4084-4087.
- BRACCO, U., GRAILHE, N., ROSTAGNO, W. and EGLI, R.H. 1962. Analytical evaluation of cocoa curing in the Ivory Coast. *J Agric Food Chem*, 20, 713-717.
- CEMEROĞLU, B. 2009. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 3. Baskı, 1. Cilt, Sayfa 481-484.
- CEMEROĞLU, B. 2010. Gıda Analizleri. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, Ankara, 2. Baskı, Sayfa 48-49.
- DOWD, M. K. and STEVENS E. D. 2002. The crystal structures of D-Pinitol and L-quebrachitol by low-temperature X-ray diffraction. *J Carbohyd Chem*, 21(5): 373-383.
- DOZOIS, K., PIERRE, C., JELLEFF, C. and KRANTZ, J. C. 1938. Sugar alcohols XVII. The utilization of sorbitol, styracitol, sorbose, pinitol, primulitol and hydroxypyruvic aldehyde by various microorganisms. *J Bacteriol*, 36(6): 599-604.
- DROUVEN, H., FABRY, I., GÖPEL, G. 1996. *Techonology for sweets*, Drouven & Fabry GmbH, 124 p.
- ERGÖNÜL, P. G. 2011. Bitkisel yağların vinterizasyonunda kullanılan filtre yardımcı maddelerin yağ kaybı ve yağ kalitesi üzerine olan etkileri. Celal bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- GRAIG, W. J. and NGUYEN, T. T. 1984. Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products, *J Food Scien*, 49(1): 302 – 303.
- GORHAM, J., MCDONNELL, E. and JONES, R. G. W. 1984. Pinitol and other solutes in salt-stressed *Sesbania aculeata*. *Z Pflanzenphysiologie*, 114(2):173-178.
- GUO, C. X. and OOSTERHUIS, D. M. 1995. Pinitol occurrence in soybean plants as affected by temperature and plant-growth regulators. *J Exp Bot*, 46(283):249-253.

- KARKACIER, M., ARTIK, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua L.*) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları, *Gıda*, 20(3): 131-136.
- KIM, J. C., SHIN, J. Y., SHIN, D. H., KIM, S. H., PARK, S. H., PARK, R. D., PARK, S. C., KIM, Y. B. and SHIN, Y. C. 2005. Synergistic antiinflammatory effects of pinitol and glucosamine in rats. *Phytother Res*, 19(12): 1048-1051.
- KORKUBILMEZ, M. 2005. Farklı Orjinli Kakao Çekirdeklerinden Elde Edilen Kakao Likörlerinin Çikolatanın Lezzetine Olan Etkisi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1-29 s.
- LEHRMAN, D. W., PATTERSON G. R. 1983. Cocoa Fermentation., Human Foods, Food Microbiology and Fermentation.
- MEER, W. A. 1979. Carob as a substitute or extender for cocoa. *Manufacturing Confectioner*, 59(3): 41-42.
- MERCHANT, A., TAUSZ, M., ARNDT, S. K. and ADAMS, M. A. 2006. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 Eucalyptus species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant Cell Environ*, 29(11): 2017-2029.
- MINIFIE, B. W. 1982. Chocolate, cocoa and confectionary science and technology, second edition, Chicago, USA, 49, 30-35.
- MINIFIE, B. W. 1989. Chocolate, cocoa and confectionary science and technology, third edition, New York, USA, 35 - 165 s.
- MISNAVI, A., JINAP, S., JAMILAH, B., and NAZAMID, S. 2004. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Qual Prefer*, 15; 403-409.
- MOHR, W., LANDSCHREIBER, E., and SEVERIN, T. H. 1976. On the specificity of cocoa aroma. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 2, 88-95.
- MORRIS, J.R. and MAIN, G.L. 1995. Fining agents for wine. Proc.14th NM Conf.1995
- NİLÜFER, D. 2007. Soya Ürünlerinde Fonksiyonel Bileşenlerin Karakterizasyonu ve Soya Ekmeği Özelliklerine Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- ORTHEN, B. and POPP, M. 2000. Cyclitols as cryoprotectants for spinach and chickpea thylakoids. *Environ Exp Bot*, 44(2): 125-132.
- ORTHEN, B., POPP, M. and BARZ, W. 2000. Cyclitol accumulation in suspended cells and intact plants of *Cicer Arietinum L.* *J Plant Physiol*, 156(1): 40-45.

- ROSEIRO, J. C., GIRIO, F. M. and COLLACO, A. 1991. Yield improvements in carob sugar extraction, *Process Biochem*, 26: 179 – 182.
- SIDINA M. M., EL HANSALI, M., WAHID, N., OUATMANE, A., BOULLI, A. and HADDIOUI, A. 2009. Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua L.*) in Morocco, *Scientia Horticulturae*, 123(1): 110-116.
- STREETER, J. G. 2001. Simple partial purification of D-pinitol from soybean leaves. *Crop Scien*, 41(6): 1985-1987.
- TUNALIOĞLU, R. ve ÖZKAYA, M. T. 2003. Keçiboynuzu, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E-Bakış, 5(3): 1- 4.
- TETİK, N., TURHAN, I., OZİYCI, H. R. And KARHAN, M. 2011. Determination of D-pinitol in carob syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 62(6): 572-576.
- YALIM, S. K. 2010. Keçiboynuzu Meyvesinden Yüksek Safılıkta Şeker Şurubu Üretimi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1-8 s.
- YOUSIF, A. K. and ALGHZAWI, H. M. 2000. Processing and characterization of carob powder, *Food Chem*, 69: 283-287.
- YURDAGEL, Ü., TEKE, İ. 1985. Keçiboynuzu Meyvesinin Kavrulması İle Oluşan Renk Değişimlerinin Araştırılması. *Gıda Tek*, 1 (1985) 39- 42.

ÖZGEÇMİŞ



Ahmet Alp KARAMANOĞLU 1989 yılında Ordu'da doğdu, ilk ve orta öğrenimini Ordu'da tamamladı. 2007 yılında başladığı Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimine devam ederken bir yandan da gıda alanında çeşitli yatırım projelerinde proje sorumlusu olarak görev aldı. Hâlihazırda Ordu ilinde gıda ve yem alanında üretim ve toptan satış alanlarında faaliyet gösteren bir gıda firmasında yönetici olarak çalışmaktadır.