

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL YAĞLARDA ISIL İŞLEM SONUCU ORTAYA
ÇIKAN 3-MCPD VE BİYOAKTİF BİLEŞEN DEĞİŞİMİNİN
İNFRARED TEMELLİ HIZLI ANALİZ TEKNİKLERİ İLE
BELİRLENMESİ**

Hakan BAŞDOĞAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Salih KARASU

Kasım, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL YAĞLARDA ISIL İŞLEM SONUCU ORTAYA
ÇIKAN 3-MCPD VE BİYOAKTİF BİLEŞEN DEĞİŞİMİNİN
İNFRARED TEMELLİ HIZLI ANALİZ TEKNİKLERİ İLE
BELİRLENMESİ**

Hakan BAŞDOĞAN tarafından hazırlanan tez çalışması 08.11.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Salih KARASU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Salih KARASU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY, Üye

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Prof. Dr. Bülent ÇETİN, Üye

ATATÜRK Üniversitesi

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Salih KARASU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan bitkisel yağlarda ısıtıl işlem sonucu ortaya çıkan 3-mcpd ve biyoaktif bileşen değişiminin infrared temelli hızlı analiz teknikleri ile belirlenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerin ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hakan BAŞDOĞAN

İmza

Aras ve Arya'ma...

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince bana sunduğu bilgi ve deneyimleriyle, çalışmama her türlü katkı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Salih KARASU'ya,

Bu süre zarfında destekleriyle beni yalnız bırakmayan değerli Hocalarım Sn. Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY, Sn. Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Sn. Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ, Sn. Dr. Ruşen Metin ve arkadaşlarım Perihan Kübra Akman, Zeynep Hazal TEKİN ÇAKMAK'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi, manevi fedakârlıklar yapan, haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim aileme sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Değerli eşim, şahane insan Günay BAŞDOĞAN'a hayatımda olduğu her an için ve bu süreçte gösterdiği destek için sonsuz teşekkürler. Arya'm, Aras'ım bu tez sizin için.

Hakan BAŞDOĞAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	3
1.1.1 3-MCPD'nin Yapısı	3
1.1.2 3-MCPD Oluşum Mekanizması	4
1.1.3 Gıdalarda 3-MCPD Oluşumu	9
1.1.4 3-MCPD Absorbsiyonu, Metabolizması ve Toksisitesi	13
1.1.5 Gıda Örneklerinde 3-MCPD İçin Kullanılan Analitik Prosedürler	15
1.1.6 Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi	18
1.1.7 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	25
1.1.8 Kabak Çekirdeği ve Yağı	25
1.2 Tezin Amacı	27
1.3 Hipotez	28
2 MATERYAL VE YÖNTEM	30
2.1 Materyal	30
2.2 Analiz Yöntemi	31
2.2.1 Gc-Ms Metodu	31
2.2.2 NIR Yöntemi	35
2.2.3 NIR İstatistiksel Analiz	35
2.2.4 Kabak Çekirdeği ve Kabak Çekirdeği Yağının Fizikokimyasal Analizi	36
2.2.5 Sterol Kompozisyon Tayini	36
2.2.6 Yağ Asidi Bileşim Tayini	37
2.2.7 Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesinin Ekstraksiyonu	37
2.2.8 Toplam Fenolik İçerik (TPC) Tayini	37
2.2.9 DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini	38
2.2.10 Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi	38

2.2.11 In-Vitro Sitotoksiklik Analizi	38
2.2.12 Antienflamatuvar Aktivite	39
2.2.13 İstatistiksel Analiz	40
3 BULGULAR VE TARTIŞMA	41
3.1 Gc-Ms ile 3-MCPD Analizleri ve NIR Kalibrasyonu	41
3.2 Metod Validasyon/Verifikasyon	45
3.3 Balkabağı Çekirdeği Yağı	60
3.3.1 Fizikokimyasal Özellikleri	60
3.3.2 Sterol ve Yağ Asidi Bileşimleri	61
3.3.3 Toplam Fenolik, Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Bileşim Değişimleri	64
3.3.4 In-vitro Sitotoksiklik Analizi	66
3.3.5 Antienflamatuvar Aktivite	69
3.3.6 FTIR Spektrometrik Analizi	70
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKÇA	74
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	87

SİMGE LİSTESİ

P	Basınç
β	Beta
dk	Dakika
g	Gram
Eq	Ekivalan
kg	Kilogram
Ac	Kontrol Emiciliği
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mEq	MiliEkivalan
ml	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
ppm	Milyonda bir birim
nm	Nanometre
As	Örneğin emiciliği
cm	Santimetre
s	Saniye
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ANN	Yapay Nöral Ağ
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi ²³
FFA	Serbest Yağ Asitliği
FID	Alev İyonlaştırma Dedektörü
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IP	İndikasyon Süresi
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
MLR	Çoklu Doğrusal Regrasyon
MSC	Çoğaltıcı Saçılma Düzeltme
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asidi
ND	Tespit Edilmedi
NIR	Yakın-Kızılötesi Spektroskopisi
PCR	Temel Bileşen Regresyonu
PSL	Kısmı En az Karaler
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
PV	Peroksit Değerleri
RSD	Bağlı Standart Sapma
SFA	Doymuş Yağ Asidi
SG	Savitzky Golay Algoritması
SM LR	Adımsal Çoklu Lineer Regresyon
SNV	Standart Normal Değişken
SR	Standart Sapma
TEFC	Trolox Eşdeğerinin Antioksidan Kapasitesi
TPC	Toplam Fenolik İçerik
UV	Ultraviole
2-MCPD	2-monokloropropan-1,2-diol
3-MCPD	3-monokloropropan-1,2-dio

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Monoklopropandiol izomerleri ve prokiral molekül L-gliserol ile ilişkisi (Hamlet vd., 2002)	3
Şekil 1.2 3-MCPD'nin tipik reaksiyonları (Hamlet vd., 2002).....	4
Şekil 1.3 3-MCPD'nin Bakteriyel ve Memeli Metabolik Yolu	14
Şekil 1.4 3-MCPD'nin Türevlendirme Reaksiyon Ürünleri: (a) HFBI; (b) PBA ve (c) Aseton.....	16
Şekil 3.1 Gc-Ms çıktısı örneği 1.....	43
Şekil 3.2 Gc-Ms çıktısı örneği 2.....	44
Şekil 3.3 PSO örneklerinin 30 mg/ml'si ile tedavi edilen Caco-2 hücrelerinin ters mikroskop görüntüleri.....	68
Şekil 3.4 PSO1, PSO2 ve PSO3 yağ örneklerinin FTIR spektrumları.....	71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Çeşitli gıdalarda belirlenen 3-MCPD konsantrasyonları	9
Tablo 1.2 Ham ve rafine bitkisel yağlarda tespit edilen 3-mpcd miktarları.....	12
Tablo 2.1 GC Fırın sıcaklık programı	33
Tablo 3.1 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	41
Tablo 3.2 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
Tablo 3.3 1.Analistin LOD- LOQ çalışma sonuçları	46
Tablo 3.4 2.Analistin LOD- LOQ çalışma sonuçları	47
Tablo 3.5 Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları	48
Tablo 3.6 2. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçlar	49
Tablo 3.7 1. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları	50
Tablo 3.8 2. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları	51
Tablo 3.9 1. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirliklik ve geri kazanım sonuçları	52
Tablo 3.10 2. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirliklik ve gerikazanım sonuçları ...	53
Tablo 3.11 1. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirliklik ve gerikazanım sonuçları	54
Tablo 3.12 2. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirliklik ve gerikazanım sonuçları	55
Tablo 3.13 Elde edilen ortalama geri kazanım sonuçları	56
Tablo 3.14 Düşük konsantrasyon için tekrar üretilebilirlik sonuçları.....	56
Tablo 3.15 Yüksek konsantrasyon için tekrar üretilebilirlik sonuçları	57
Tablo 3.16 Düşük konsantrasyon için grubbs testi	58
Tablo 3.17 Yüksek konsantrasyon için grubbs testi.....	58
Tablo 3.18 Düşük konsantrasyon için anova testi sonuçları	58
Tablo 3.19 Yüksek konsantrasyon için anova testi sonuçları	59
Tablo 3.20 PSO örneklerinin toplam sterol miktarı ve bireysel sterol bileşimleri.....	62
Tablo 3.21 PSO örneklerinin yağ asidi bileşimi	63
Tablo 3.22 TPC, DPPH Ve PSO örneklerinin bireysel fenolik bileşimleri	65
Tablo 3.23 PSO örneklerinin Caco-2 adenokarsinom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi	67
Tablo 3.24 Protein denatürasyon tahlili ile incelenen pso örneklerinin göreceli antienflamatuar aktivitesi.	69

BİTKİSEL YAĞLARDA ISIL İŞLEM SONUCU ORTAYA ÇIKAN 3-MCPD VE BİYOAKTİF BİLEŞEN DEĞİŞİMİNİN İNFRARED TEMELLİ HIZLI ANALİZ TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Hakan BAŞDOĞAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç Dr. Salih KARASU

Birinci çalışmanın amacı gıda proses kaynaklı kontaminant olarak tanımlanan 3-monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD) bileşiğini tespit etmek amacı ile alternatif bir yöntem olarak NIR teknolojisi kullanarak yeni bir analiz yöntemi geliştirmektir. Gc-Ms analizinin uzun ve maliyetli bir analiz olması nedeniyle günlük olarak yapılıp, üretimi yönlendirebilmesi pratikte mümkün görünmemektedir.

Bu neden dolayı, daha hızlı ve maliyet açısından daha ekonomik yollara ihtiyaç duyulmaktadır. NIR teknolojisi şu aşamada en alternatif yöntem görünmektedir

NIR ile yapılan Verifikasyon sonuçlarına göre metod performans değerleri; ortalama geri kazanım %96, tekrarlanabilirlikte max % RSD : 3,7 olarak hesaplanmış ve tespit limiti (LOD) : 0,10 mg/kg , ölçüm limiti (LOQ): 0,30 mg/kg olarak bulunmuştur. Yapılan verifikasyon çalışması sonucunda belirsizlik hesabı yapılmıştır. Ölçüm belirsizlik değeri % 95 güven aralığında $k=2$ için genişletilmiş belirsizlik değeridir ve % 8,5 olarak

bulunmuştur. Bu veriler ışığında yapılan verifikasyon çalışması sonuçları NIR ile yapılan 3-MCPD kalibrasyonun etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

İkinci bir çalışma olarak; kabak çekirdeği yağının fizikokimyasal özellikleri, yağ asidi, sterol, fenolik bileşimi, in-vitro sitotoksik testi ve anti-inflamatuar aktivitesi üzerine pres sıcaklığının etkisini araştırmayı ve bu farklılıkların infrared temelli FTIR yöntemi ile belirlenmesi amaçlamıştır. Bu amaçla 100°C (PSO2) ve 150°C (PSO3) pres sıcaklığında elde edilen yağlar, soğuk pres yağı (PSO1) ile karşılaştırılmıştır. 150°C'de pres sıcaklığının uygulanması sterol miktarında önemli bir azalmaya neden olurken, 100°C'de önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. PSO2 ve PSO3 örneklerinin toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite değerleri ve bireysel fenolik içeriği, PSO1'den önemli ölçüde düşüktü. 30 mg/mL PSO1, PSO2 ve PSO3 numuneleri, hücreler üzerinde sırasıyla %75, %48 ve %39 inhibisyon oranı ile sitotoksik bir etki sergiledi, bu da pres sıcaklığının kabak çekirdeği yağının sitotoksik etkisini azalttığını gösterdi. PSO1, %79 ila %59 arasında değişen anti-inflamatuar aktivite gösterirken, aynı konsantrasyonlarda PSO2 ve PSO3 yaklaşık olarak %58 ila %49 sergilemiştir. Ayrıca FTIR ile çalışmalar kalibre edilmeye çalışılmış, belirgin bir ayraç bulunamamıştır. Bu çalışma, soğuk pres yağının biyoaktif özelliklerinin yüksek pres sıcaklığından olumsuz etkilenebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 3-MCPD, NIR, kabak çekirdeği yağı, sitotoksik etki, anti-inflamatuar aktivite

DETERMINATION OF 3-MCPD AND BIOACTIVE COMPONENT CHANGE RESULTING FROM HEAT TREATMENT IN VEGETABLE OILS BY INFRARED-BASED RAPID ANALYSIS TECHNIQUES

Hakan BAŞDOĞAN

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih KARASU

The aim of the first study our aim is to develop a new analysis method using NIR technology as an alternative method to detect 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD), which is defined as a food process-derived contaminant. Since Gc-Ms analysis is a long and costly analysis, it does not seem possible in practice to be able to do it on a daily basis and direct production.

For this reason, faster and more cost-effective ways are needed. NIR technology seems to be the most alternative method at this stage.

Method performance values according to the results of the Verification with NIR; The mean recovery was calculated as 96%, the reproducibility max % RSD: 3.7, and the detection limit (LOD): 0.10 mg/kg, the measurement limit (LOQ): 0.30 mg/kg. As a result of the verification study, uncertainty calculation was made. The measurement uncertainty value is the expanded uncertainty value for k=2 at the 95% confidence interval and was

found to be 8.5%. In the light of these data, the results of the verification study show that the 3-MCPD calibration with NIR can be used effectively.

As a second study; The aim of this study was to investigate the effect of press temperature on the physicochemical properties, fatty acid, sterol, phenolic composition, in-vitro cytotoxicity test and anti-inflammatory activity of pumpkin seed oil and to determine these differences by infrared-based FTIR method. For this purpose, oils obtained at 100°C (PSO2) and 150°C (PSO3) press temperatures were compared with cold press oil (PSO1). The application of the press temperature at 150°C caused a significant decrease in the amount of sterol, while it did not cause a significant change at 100°C. Total phenolic content, antioxidant capacity values and individual phenolic content of PSO2 and PSO3 samples were significantly lower than PSO1. Samples of 30 mg/ml PSO1, PSO2 and PSO3 exhibited a cytotoxic effect on cells with an inhibition rate of 75%, 48% and 39%, respectively, indicating that the pressing temperature reduced the cytotoxic effect of pumpkin seed oil. PSO1 showed anti-inflammatory activity ranging from 79% to 59%, while PSO2 and PSO3 at the same concentrations showed approximately 58% to 49%. In addition, studies were tried to be calibrated with FTIR, but no clear reagent could be found. This study showed that the bioactive properties of cold press oil can be adversely affected by high press temperature.

Keywords: 3-MCPD, NIR, pumpkin seed oil, cytotoxic effect, anti-inflammatory activity

3-Monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD), 1978'de ilk kez asit hidrolize bitkisel protein (HVP) ve soya sosu ürünlerinde tespit edildiğinden beri gıda işleme kontaminantı olarak bilinmektedir (Velisek vd., 1980). 3-MCPD, 1,3-dikloro-propan-2 -ol (3-DCP) gibi bilinen genotoksik hayvan karsinojenlerini de içeren kimyasal kirleticiler grubu olan kloropropanollerin bir üyesidir. Kloropropanoller potansiyel toksisiteleri ve olası sağlık etkileri konusunda birçok araştırmanın konusu olmuştur. Araştırmalar devam etmekle birlikte 3-MCPD'nin insan böbreklerine ve üreme organlarına zarar verdiği bildirilmiştir (Xing vd.,2019). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda 3-MCPD'nin neden olduğu kanser vakalarına dayanarak 3-MCPD'yi insanlar için muhtemelen kanserojen olarak nitelendirmektedir (IARC, 2012). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, 2016) 3-MCPD'nin kritik etkisinin böbrek toksisitesi olduğunu bildirmiştir. Bu araştırma verilerine dayanarak, EFSA (2016), toplam serbest 3-MCPD ve esterleri için tolere edilebilir günlük alım miktarını 0.8 µg / kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. JECFA (2016) ise, serbest 3-MCPD ve esterleri için günde maksimum 4 µg / kg vücut ağırlığı şeklinde bir provizyonel maksimum tolere edilebilir günlük alım (PMTDI) miktarı açıklamıştır.

3-MCPD, serbest formunda, farklı yağ asitleri ile ester formunda veya her iki formda da gıdalarda sıklıkla bulunan bir bileşiktir. 3-MCPD bileşiği, tahıl ürünleri, kahve, bebek maması, yemeklik sıvı ve katı yağlar gibi diğer birçok gıda maddesinde, yaygın olarak mono- veya di-esterleri şeklinde bulunmuştur. 3-MCPD'nin serbest formu, asit-hidrolize bitkisel protein soya sosunda, 10 ülkeden 2.035 gıda örneği anketinde toplanan verilere göre, 3-MCPD seviyeleri 1.779 mg / kg'a kadar bulunmuştur (Lee & Khor, 2015). 3-MCPD esterleri, gastro-intestinal kanaldaki serbest 3-MCPD formuna hızla hidrolize edilebilir (Abraham vd., 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinin (2016) bilimsel görüşüne göre, esterlerden en yüksek 3-MCPD seviyeleri (> 5.210 µg / kg) palm yağlarında bulundu, ancak çoğu bitkisel sıvı ve katı yağlar da önemli miktarlar içermekteydi. (Baer vd., 2010; Habermeyer vd., 2011; Jedrkiewicz vd., 2016; Schilter vd., 2011). Günlük diyetle ekmek, erişte, et, kek ve bisküvi gibi büyük miktarlarda yenilen gıdaların 3-MCPD alımına önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmektedir.

Bu gıdalarda yüksek alım, üründe yüksek bir 3-MCPD seviyesinden ziyade yenen miktardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca sosis kılıfları, çay poşetleri, kahve filtresi gibi gıda kaplama malzemelerinde sıklıkla bulunan anahtar bileşik epiklorhidrin de gıdaları etkileyebilir ve 3-MCPD bu tip kaplama malzemeleriyle temas eden gıdalarda da ortaya çıkabilir. Dolayısıyla, 3-MCPD'nin, sadece düşük seviyelerde mevcut olmalarına rağmen, bu kontaminantı içeren yiyeceklerin çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda kaçınmanın zor olduğu görülmekte ve tüketiciler zaman zaman kısa bir süre için yüksek seviyelerde 3-MCPD'ye maruz kalabilirler (Baer vd.,2010; Chung vd., 2008)

İkinci çalışma olan balkabağı çekirdeği yağına baktığımız zaman: Balkabağı çekirdeği yağı %73-80, esas olarak linoleik (% 36-61) ve oleik asitler (% 21-47) içeriğine sahiptir. Kabak çekirdeği yağının bu doymamış yağ asidi bileşimi, gıdaların besinsel faydalarını iyileştirmesini sağlar. Koyu yeşilimsi bir renge ve güçlü fındık aromasına sahip yağ esas olarak salata sosu için kullanılır. Fenolik bileşiklerin, tokoferollerin ve sterollerin varlığı kabak çekirdeğinin bir başka faydalı özelliğidir (Parry, Cheng, Moore, & Yu, 2008). Sebzelerdeki fitokimyasalların güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Gıda matrislerindeki antioksidan aktiviteye bağlı olarak kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli patolojilerin gelişme riskinin azaldığını gösteren çok fazla çalışma vardır (Hang vd., 2004; Wan ve ark., 2014).

Son yıllarda, tüketici eğilimi, esas olarak bu yağların beslenme ve sağlık yararları olduğuna dair artan kanıtlar nedeniyle dünya çapında soğuk-preslenmiş yağlara doğru değişmiştir (Neđeral ve ark., 2012). Soğuk-preslenmiş yağlar herhangi bir kimyasal ve ısı uygulaması olmadan üretildiğinden, besin bileşenleri ve duyuşal özellikleri rafine yağlardan daha iyi korunur. Esansiyel yağ asitleri, fenolik maddeler ve tokoferoller gibi doğal antioksidanlar ve steroller gibi lipofilik biyoaktif bileşenler içerdiğinden beslenme ve duyuşal açıdan bir tür fonksiyonel gıda olarak atfedilirler (Akcicek & Karasu, 2018; Tekin-Çakmak, Karasu, Kayacan-Çakmakoglu, & Akman, 2021; Tekin & Karasu, 2020). "Soğuk-preslenmiş yağ" yağı herhangi bir sıcaklık uygulaması yapılmadığı anlamına gelse de, sürtünme ve yüksek çalışma basınçları nedeniyle presleme işlemi sırasında sıcaklık kendiliğinden artar (Neđeral ve ark., 2012).

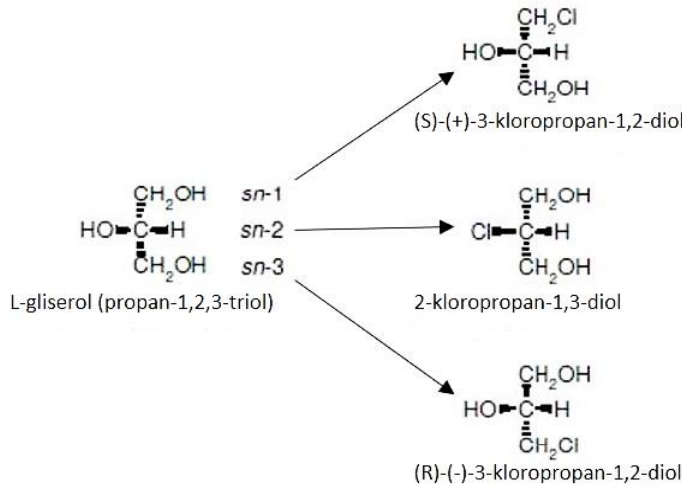
Kabak çekirdeğinden yağ elde etmek için hem sıcak hem de soğuk pres işlemleri kullanılır. Bununla birlikte, geleneksel yöntemde, su ve tuzla bir hamur oluşturduktan sonra, hamur 100-130 °C'de 60 dakikaya kadar kavrulur.

Bu da protein fraksiyonu pıhtılaşmasına katkıda bulunur ve lipid fraksiyonunun preslenerek kolayca çıkarılmasına neden olur(Raczyk, Siger, Radziejewska-Kubzdela, Ratusz, & Rudzińska, 2017). Bu açıdan bakıldığında, balkabağı tohumlarının yağı üretmek için kavrulması ve soğuk pres işlemlerinde yüksek presleme sıcaklığının yanı sıra yağın besin kalitesini etkiler.

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 3-MCPD'nin Yapısı

K3-MCPD (CAS kayıt No. 96-24-2), soluk ve hoş bir kokuya sahip renksiz, hafif yağlı bir sıvıdır. 3- MCPD, kaynama noktası 213°C'dir ve 1.3204 g/cm³ (20°C) yoğunluğa sahiptir. Su ve etanol içinde kolayca çözünür.



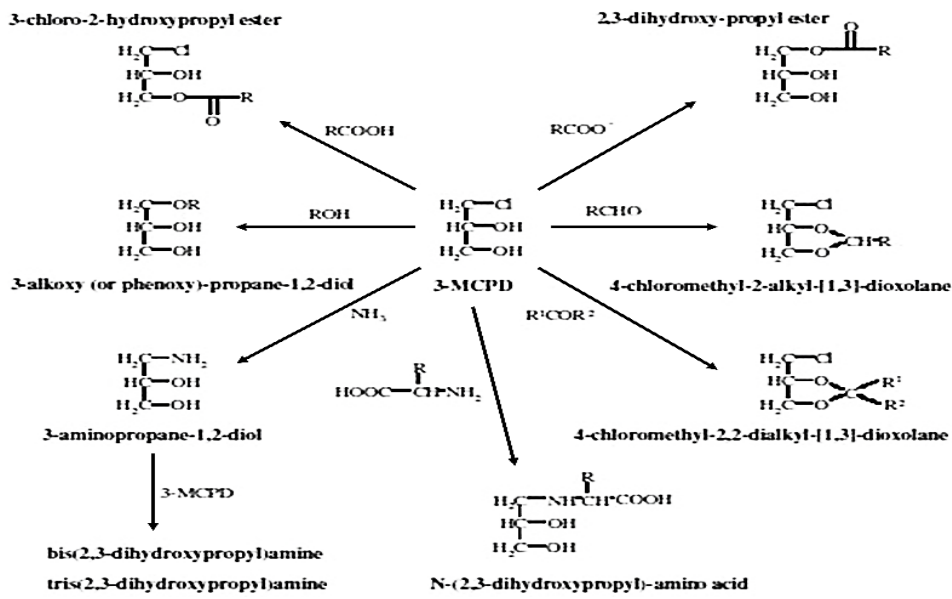
Şekil 1.1 Monokloropropandiol izomerleri ve prokiral molekül L-gliserol ile ilişkisi (Hamlet vd., 2002)

Stabilitesi:

3-MCPD ve 2-MCPD'nin stabiliteleri henüz gıda sistemlerinde ilgilenilen pH ve sıcaklık aralıkları üzerinde tam olarak araştırılmamıştır. 3-MCPD ve 2-MCPD, sulu alkalın ortam içinde nispeten kararsızdır ve ara epoksit glisidol yoluyla gliserole ayrıştırılır. Bu reaksiyon, özellikle ticari hidrolize bitkisel proteinlerde 3-MCPD seviyesini azaltmak için yaygın olarak kullanılır (Hamlet vd., 2002). Dolezal ve Velisek (1992,1995), monokloropropandiollerin bozunma reaksiyonlarını, 5 - 9 pH aralığında ve 25 ila 85 ° C sıcaklıklarda sulu model sistemlerinde incelenmişler ve 3-MCPD'nin stabilitesinin hem pH hem de sıcaklığa çok duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Tepkimeleri:

3-MCPD, hem alkollerin hem de alkil kloritlerin karakteristik reaksiyonlarına girer ve asitler, alkoller, aldehydler, amonyak, amino bileşikleri, ketonlar ve tiyollerle kolayca reaksiyona girer (Velisek vd., 1991). 3-MCPD'nin tipik reaksiyonları Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 1.2 3-MCPD'nin tipik reaksiyonları (Hamlet vd., 2002).

1.1.2. 3-MCPD Oluşum Mekanizması

3-MCPD'nin oluşum yolları üç gruba ayrılabilir. İlk yol, hidroklorik asidin artık bitkisel yağ ile reaksiyonu olan asit hidrolizidir (HVP üretiminde kullanılır). İkinci yol, asit-HVP varlığından bağımsız olan ısı işlemidir. Bu şekilde, malzemede doğal olarak bulunabilen veya işleme sırasında ilave edilebilen lipidler ve sodyum klorürden 3-MCPD oluşur. Isı, yiyecekleri sadece endüstriyel üretim sırasında değil aynı zamanda ev yemeklerinde pişirme veya kızartma gibi işlemler sırasında da etkileyebilir. Üçüncü ve son zamanlarda en çok incelenen yol, serbest 3-MCPD'nin bağlı (esterlenmiş) formundan salınmasıdır. 3-MCPD, genellikle palmitik, oleik veya stearik yağ asitlerinin mono ve diesterlerinin bir karışımı olarak ortaya çıkabilir. 3-MCPD esterlerinin oluşum mekanizması şimdiye kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Collier ve arkadaşları tarafından 1991'de yayınlanan bir hipotez, triaçilgliserol reaksiyonuna dayanan bir mekanizma önerdi;

Buradaki önemli bir adım, bir kloropropandiol diester ile sonuçlanan komşu ester grupları tarafından aktive edilen konumlarda açıl grubunun klorür anyonu tarafından nükleofilik yer değiştirmesidir. Daha yeni bir varsayıma göre, 3-MCPD esterlerin oluşumu, bir ara madde olarak siklik asiloksonyum iyonu boyunca ilerler ve bu, mono- ve di açilgliserollerden (MAG ve DAG) hidroksil gruplarının atılmasından türetilir (Bakhiya vd., 2011). Rahn ve Yaylayan (2011), palmitin sistemlerindeki bu ara iyon oluşumunu kızılötesi (IR) spektroskopisi ve bir izotop etiketleme tekniği kullanarak izleyerek bu hipotez için daha fazla kanıt sağlamıştır. Yukarıdaki varsayımların her ikisi de, 3-MCPD esterlerinin oluşumu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olarak görünen klorür iyonlarının varlığını dikkate almaktadır (Shimizu vd., 2013).

3-MCPD, sindirim sırasında insan gastrointestinal sistemindeki lipaz katalizli hidroliz yoluyla esterleştirilmiş formundan salınabilir. Robert ve arkadaşları tarafından 2004 yılında memeli, bitki ve mantar lipazları, bitkisel yağ veya yağ, su ve sodyum klorürden oluşan bir model kullanılarak kloropropanollerin oluşumunu simüle eder. Üç yıl sonra Seefelder vd. (2008) ester formundan 3-MCPD salım seviyesini ölçmek için basit bir bağırsak modeli kullanmıştır. Mono ve diesterler pankreatik lipaz ve domuz safra özütü ile inkübe edilmiştir. Monoesterler bir dakika sonra neredeyse tamamen hidrolize edilmiştir. Diesterlerden 3-MCPD salınımı daha yavaştı, bir dakika sonra %45'e, iki dakika sonra %65'e ve yaklaşık bir saat sonra neredeyse %100'e ulaşmıştır. Ayrıca, yazarlar, 3-MCPD esterlerinin, insan sindirimi sırasında açilgliseroller için bilinen ile aynı metabolik yola sahip olduklarını, burada pankreatik lipazların gliserolü sadece 1- ve 3-monoaçilgliserollerden salgıladığını ileri sürmüşlerdir. Triaçilgliseroller, diaçilgliserollere hidrolize edilir ve lipoproteinlere dahil edilir. Bununla birlikte, bu hipotez spekülatif görünüyordu, çünkü çalışmalar zaten diester formundan serbest 3-MCPD'nin kısmen serbest bırakıldığını kanıtladı. Ayrıca, lipoproteinler lenfatik sistem yoluyla biyolojik olarak temin edilebilir (Chon vd., 2007). Lipolitik enzimlerle ilgili son araştırmalara göre, triaçilgliserollerini tamamen hidrolize edebilen üç enzim vardır (Lass vd., 2011). Dolayısıyla, bu enzimlerin diester formundan serbest 3-MCPD salgılayabileceği varsayılabilir (Abraham vd., 2013). Şimdiye kadar, yukarıda belirtilen önerileri doğrulamak için hiçbir in-vivo araştırma yapılmamıştır; bu nedenle, insan sağlığı riski değerlendirilirken 3-MCPD esterlerinin %100 hidrolizi varsayımı dikkate alınmalıdır.

Yukarıda açıklanan 3-MCPD'nin oluşum yollarının yanı sıra başka yollar da önerildi. Myszkowski ve Zielinski (1965), monokloropropandiolün alil alkol, klor ve sudan oluşabileceğini varsaymıştır. Collier ve diğ. (1991) karbonhidratlardan (pentosan ve pektin) ve hidroklorik asitten 3-MCPD oluşumu olasılığını bildirmiştir. Cerbulis ve diğ. (1984) çiğ keçinin sütünde küçük fakat önemli miktarlarda 3-MCPD diesterlerinin izole edildiğini göstermiştir; bu nedenle yazarlar, bu bileşiklerin gıdada doğal olarak oluştuğunu varsaymışlardır. Bununla birlikte, bu öneriler daha sonraki çalışmalarda kanıtlanmamıştır (Jedrkiewicz vd., 2016).

1.1.2.1 Asit hidrolizi

Ticari olarak hidroliz, 4-24 saat boyunca 100 °C- 130 °C'de 4-6 M hidroklorik asit kullanılarak gerçekleştirilir, bunu sodyum hidroksit ile nötralizasyon izler. Bu işlem sırasında asidin artık bitkisel yağ ile reaksiyonundan 3-MCPD oluşur. Hammaddelerdeki hidroklorik asit, triaçilgliseroller, fosfolipidler ve gliserol, kloropropanollerin ana öncüleridir (FAO, WHO ,2007). Velisek vd. (1978) ve Davidek vd. (1980) tarafından hidrolize bitkisel protein üretimi sırasında gliserol ve hidroklorik asitten klorohidrin oluşumu doğrulanmıştır. Collier vd. (1991) ve Hamlet vd.(2002) daha sonra asidik koşullar altında triaçilgliserollerden kloropropanollerin ısı kaynaklı oluşumunu açıklayan bir mekanizma önermişlerdir. Önerilen mekanizmaya göre komşu ester grupları tarafından aktive edilen pozisyonlarda açıl grubu ile klorür anyonu arasında nükleofilik yer değiştirme gerçekleşir. Ortaya çıkan ara ürün, hidrolitik koşullar altında kloropropanol sağlayan bir kloropropandiol diesterdir. (Baer vd.,2010; Davidek vd.,1980; Velisek vd., 1978)

1.1.2.2 Isıl İşlem

3-MCPD, pişirme ve ızgara gibi normal üretim ve pişirme işlemleri sırasında lipitlerden ve sodyum klorürden oluştuğu görülmektedir (FAO, WHO, 2007). Trigliseritlerin yüksek sıcaklıktaki hidrolizi sonucunda salınan serbest gliserol, klorlu bileşiklerle reaksiyon verebilir (Massey, 2007; Massey & Hamlet, 2007). 3-MCPD oluşumu ayrıca su, sodyum klorür ve gliserol, fosfolipid veya triolein bazlı model sistemler üzerinde yapılan çalışmalardan edinilen bilgilere göre diğer faktörlere de bağlıdır. Öncü olarak gliserol ile 3 MCPD üretimi, %30 neme kadar artış gösterir, ancak daha yüksek nem seviyelerine çıkıldığında 3-MCPD üretimi azalır. Ayrıca, çok düşük su içeriklerinde bile gliserol 3-MCPD üretebilmektedir.

Bu nedenle 3-MCPD, düşük su içeriğine sahip gıdalarda (<% 15) gliserol etkisiyle oluşabilirken, yüksek nem içeriğine sahip gıdalarda ise lesitin gibi diğer öncülerin etkisiyle oluşabilmektedir. Modeller, 3-MCPD üretiminin 160 ° C'nin üzerinde artan sıcaklıklarda arttığını, pH'dan büyük ölçüde etkilendiğini ve pH 6'nın üzerinde stabilitesini koruyamadığını göstermiştir (Stadler & Lineback,2009; Calta vd.,2004; FAO, WHO, 2007; Hamlet, Sadd & Gray, 2003; Reece vd., 2005).

1.1.2.3 Esterler

Yapılan çalışmalarda, pişirme işlemi sırasında fırın sınıfı lipaz ile muamele edildiklerinde ekmekten önemli miktarda 3-MCPD'nin serbest kaldığı bildirilmiştir. Ayrıca hidrolitik enzimlerin kloropropanollerin oluşumunda doğrudan rol oynayabileceği de görülmektedir. Lipaz, bitkisel yağ veya yağ, su ve sodyum klorür içeren model çalışmalarda, 3-MCPD üretiminin karışımdaki lipaz aktivitesi ile orantılı olduğu bulunmuştur. Tuz ve yağ içeren kurutulmuş tuzlu yiyeceklerde, belirli bileşenlerin kalıntı lipaz aktiviteleri, depolama ve işleme süresi boyunca istenmeyen kontaminantların oluşumunu yansıtabileceğinden ürün takip edilmelidir (FAO, WHO, 2007; Robert, Oberson & Stadler,2004; Stadler, 2007).

1.1.2.4 Öncü Bileşiğe Bağlı Oluşum

3-MCPD oluşumu hidroklorik asit, hipokloröz, gliserol, açilgliseroller ve alil alkol gibi bileşiklere bağlı olarak farklı yollarla oluşturulabilir, ancak gıdalardaki en olası oluşum kaynakları sodyum klorür (klor kaynağı) ve gliserol / açilgliseroldür (Stadler & Lineback,2009).

-Gliserolden

Gliserolün hidroklorik asit ile reaksiyonları, 3-MCPD ve 1,3-DCP oluşumuna neden olur. 3-MCPD, hidroklorik asit veya kuru hidrojen klorür gazının tek başına gliserol üzerindeki etkisiyle veya asetik asit gibi bir organik asit katalizörü varlığında oluşabilir. Sulu sistemlerde mekanizma klorür anyonunun nükleofilik bir yerdeğiştirme reaksiyonu (Sn2) ile devam eder. Bu reaksiyonlar yaklaşık 100 °C'lik sıcaklıklarda uzun süreli ısıtma gerektirir. Gliserol ve propilen glikol gibi çeşitli polioller, şekerleme ürünleri ve kurutulmuş meyve ve sebzeler dahil olmak üzere çok çeşitli gıdalarda nem tutucu ve lezzet arttırıcılar olarak kullanılır. Gliserol (ve serbest yağ asitleri) ayrıca işlenmiş gıdalarda trigliseritlerin yüksek sıcaklıkta hidrolizi ile de oluşur.

Bu mekanizma, kızartma yağının 170- 190 °C sıcaklıklara ulaştığı, yüksek nemli kızartılmış gıdaların hazırlanmasında özellikle önemlidir (Lawson, 1995). Bu koşullar ayrıca pişmiş, ızgara ve kavrulmuş ürünlerin kabuk bölgelerinde de bulunur. Bu koşullar altında ilave edilen veya oluşturulan gliserol, gıda maddesinde bulunan klorür anyonları ile reaksiyona girebilir.

-Alil alkolden

3-MCPD ve 2-MCPD, alil alkolün (prop-2-en-1-ol) çift bağı boyunca hipoklorik asit (HOCl) ilavesiyle oluşturulabilir. Alil alkolün klor ve su ile reaksiyonunun, %88 monokloropropandiol ve % 9 dikloropropanoller verecek şekilde 50 - 60 ° C'de hızla ilerlediği bildirilmektedir (Hamlet vd., 2002). Alil alkol, sarımsak ve ilgili türlerde bulunan bir sistein amino asidi olan alinin [(S) -alil-l-sistein sülfoksit] 'in termal ayrışma ürünüdür (Kubec ve diğ., 1997). Bu bileşiklerde alil alkolden 3-MCPD ve diğer kloropropanollerin oluşumu çok olasıdır, çünkü herhangi bir işlem prosedüründe kullanılan klorlu su hipoklorik asit ve klor (Cl₂) içerecektir. Kuru toz bileşenlerin üretilmesi için çiğ soğan ve sarımsağın (%98 su) dehidrasyonundan kloropropanol seviyelerinin önemli ölçüde artması muhtemeldir.

Lipidlerden ve hidroklorik asitten

Collier ve diğ. (1991), gliserol, triaçil gliseroller ve fosfolipitlerin 5.5 M hidroklorik asit ile reaksiyonlarını izleyerek asit-HVP'de kloropropandiol oluşumunu incelediler. Kloropropandiollerin verimi triaçilgliseroller> fosfolipidler> gliserol şeklinde azaldığı bulundu. 3-MCPD / 2-MCPD izomerlerinin hem gliserol hem de fosfatidilkolinden dağılımı, iki birincil metilen (CH₂) ve bir ikincil metinden (CH), yani yaklaşık 2: 1'deki istatistiksel ikame ile uyumluydu. Her ne kadar fosfat ve fosforil kolin iyi ayrılan gruplar olsa da, kolay intramoleküler izomerizasyona bağlı olarak az regioselektiflik (yer seçimi) gösterirler. Asetik asit ile gliserol ilavesinden ve trigiserit ile reaksiyondan gözlemlenen verim ve izomer oranı, siklik bir alkiloksanyum ara maddesinin oluşumu için kanıt sağlamıştır. Kloropropandiol izomer oranları başka hiçbir gıda maddesinde incelenmemiştir ve bu nedenle potansiyel mekanizmaların, öncüllerin bir göstergesi olabilir. Asit HVP'de oluşan 3-MCPD'nin kiral bir ayrılması bunun rasemik bir karışım olduğunu göstermiştir. Her iki enantiyomer ayrıca alkali ile muamele edildiğinde eşit bozunma oranları göstermiştir (Hamlet vd., 2002).

Sulu hidroklorik asit ile karbonhidratlardan

Collier vd. (1991) çözünür pentosan (arabinoksilans) ve pektinin (esas olarak metil-esterlenmiş galakturonik asit, metilasyon derecesi 33.7) reaksiyonundan 3-MCPD oluşumuna kadar karbonhidratlar, 11 saat boyunca 5.5 M HCl ile ısıtıldı. Ham soya küspesi (lipitler) ile karşılaştırıldığında toplam kloropropandiolün veriminin azalması, karbonhidrat öncüllerinin olası formasyonuna bağlandı. Kloropropandiollerin karbonhidratlar parçalarından ziyade hidroklorik asidin pentosan ve pektin ile ilişkili artık lipitlerle reaksiyonundan kaynaklanması daha olasıdır.

1.1.3 Gıdalarda 3-MCPD Oluşumu

Geçtiğimiz yıllarda yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve kloropropanollere tehlikeli gıda toksik maddeleri olarak artan ilgi, bir dizi farklı gıda maddesinde 3-MCPD'nin belirlenmesine neden oldu. İncelenen gıdalar ısıtılmış gıdalar, yemeklik sıvı ve katı yağlar ve bebek gıdaları (anne sütü dahil) olmak üzere 3 ana başlık altında toplanmıştır. Çeşitli gıdalarda yapılan bazı çalışmalarda belirlenen 3-MPCD konsantrasyonları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1 Çeşitli gıdalarda belirlenen 3-MCPD konsantrasyonları

Gıda	3-MCPD konsantrasyonu	Kaynak
Tahıl ve ürünleri	4-23 µg/kg	Chung vd. (2008)
Balık ve kabuklu deniz ürünleri	3-33 µg/kg	Chung vd. (2008)
Et ve ürünleri	4-32 µg/kg	Chung vd. (2008)
Patates cipsi	6-11 µg/kg	Chung vd. (2008)
Maltlarda	4-650 µg/kg	Zelinkova vd. (2006)
Kahve	100-390 µg/kg	Dolezal vd. (2005)
Patates kızartması	0.13 mg/kg	Arisseto vd. (2017)
Palm yağı	<0.25-5.8 mg/kg	Razak vd. (2012)
Palm yağı	4-5 mg/kg	Franke vd. (2009)
Kolza yağı	1 mg/kg	Franke vd. (2009)
Ayçiçek yağı	0.1-2.1 mg/kg	Kuhlmann vd. (2011)
Soya fasulyesi yağı	<0.1-0.5 mg/ kg	Kuhlmann vd. (2011)
Soğan kızartması	0.23 mg/kg	Arisseto vd. (2017)
Soğan halkası	0.14 mg/kg	Arisseto vd. (2015)
Bebek maması	0.13-4.80 mg /kg yağ	Jedrkiewicz vd. (2016)
Soya sosu	<0.01-3 mg/kg	Wong vd.(2006)
İstiridye sosu	<0.01-3 mg/kg	Wong vd.(2006)
Soğan kızartması	0.23 mg/kg	Arisseto vd. (2017)
Soğan halkası	0.14 mg/kg	Arisseto vd. (2015)
Soğan kızartması	0.23 mg/kg	Arisseto vd. (2017)
Soğan halkası	0.14 mg/kg	Arisseto vd. (2015)

1.1.3.1 Isıl İşlem Görmüş Gıdalar

Crews vd., (2001) Birleşik Krallık'ta pazarlanan çok sayıda gıda maddesini inceleyen ilk araştırmacılarıdır. 3-MCPD ile kontamine olmuş ana gıda grubu tahıldan elde edilen ürünlerdi; en yüksek monokloropropandiol konsantrasyonu kızarmış ekmek (0.088 mg / kg) ve kremalı krakerlerde (0.087 mg / kg) belirlenmiştir. Aynı gıda maddeleri grubu Breitling-Utzmann vd. (2003) tarafından analiz edilmiştir. En yüksek 3-MCPD konsantrasyonu tostlarda (iyi kızartılmış bir ekmekte > 0.500 mg / kg) ve ekmek kırıntılarında (> 0.400 mg / kg) bulundu. Yüksek sıcaklıklara maruz kalmanın tahıl kaynaklı gıdalarda 3-MCPD oluşumunda önemli bir adım olduğu görülmektedir. Breitling Utzmann ve diğ. (2005) ayrıca ekmek bileşenlerinin 3-MCPD oluşumu üzerindeki etkisini test ettiler. Yağ ve fırınlama ajanının (şeker, un, soya unu, kalsiyum sülfat ve emülgatör olarak yenilebilir yağ asitlerinin mono ve diasilgliserollerinden oluşur) ilave edilmesinin, son ürünlerdeki 3-MCPD konsantrasyonunu etkileyebileceği, emülgatörler ve şekerler ile en güçlü etkiye sahip olabileceği görülmüştür. 3-MCPD'nin öncüleri ile ilgili olarak Hamlet ve arkadaşları mayalı (Hamlet vd., 2004a) ve mayasız (Hamlet vd., 2004b) hamurlarında kloropropanollerin üretimini tahmin etmek için model hamur sistemlerini kullanmıştır. Her iki durumda da, gliserol veya monoasil gliseroller ve fosfatidil gliseroller gibi bir gliserol iskeletine dayanan bileşikler, 3-MCPD 'nin ana öncüleriydi.

Isıl işlemin 3-MCPD oluşumunu tetiklediği görülen bir diğer gıda maddesi, gıda dereceli malt taneleri, malt unları ve malt ekstraktları (renk ve lezzet ajanları) gibi malt türevi ürünlerdir. Bu ürünlerde yağ, asit veya klorür eklemeye gerek olmadan ürünün orijinal bileşenleri 3-MCPD oluşumunu teşvik edebilir. Bununla birlikte, bu tip gıdalarda önemli miktarlarda 3-MCPD sadece koyu bira maltında (0.247 mg / kg) saptanmıştır. Birada bulunan serbest 3-MCPD miktarı nispeten düşüktür (10 µg / L) (IARC, 2000), ancak serbest form içeriğini önemli ölçüde aşabilen asitler, aldehitler ve alkol gibi diğer bira bileşenlerine bağlı olabileceği görülmektedir (Divinova ve diğerleri, 2007).

Tütsülenmiş gıdalar ayrıca önemli miktarda 3-MCPD (> 0.02 mg / kg) içerir. Kuntzer ve Weisshaar (2006), fermente edilmiş sosislerde ve jambonda tütsülemenin gıda üzerindeki 3-MCPD oluşum etkisini analiz etmişlerdir. Tütsüleme süreci, özellikle odun tipi ve işleme süresi bakımından 3-MCPD'nin ana kaynağı olarak görünmektedir (Kuntzer ve Weisshaar, 2006; FAO, WHO, 2007).

Tahıl ve malt türevi ürünlerin aksine, lipitler füme gıdalarda 3-MCPD'nin öncüsü olarak kabul edilmez ve bunun yerine selülozun kırılması sırasında 3-hidroksiasetondan oluşuma dair mekanizma önerilmiştir. Bunun dışında Reece (2005), tütüleme işleminde kullanılan tuzlu sudaki tuz konsantrasyonunun da 3-MCPD oluşumunda etkili bir faktör olabileceğini öne sürmüştür.

Ayrıca, 3-MCPD, kahve gibi ısıyla işlenmiş gıda maddelerinde, özellikle uzun bir kavurma işleminden sonra kavrulmuş kahvede ve hazır kahvede (Dolezal ve diğerleri, 2005); ev tipi pişirme yoluyla hazırlanan eritilmiş veya ızgara peynirlerde (en olası öncüllerin klorür iyonları ve gliserol gibi bol miktarda bileşenler olduğu) (Crews ve diğerleri, 2001); ve gliserolün doğrudan öncü gibi görünmediği salam, domuz pastırması ve hamburger gibi etlerde belirlenmiştir (Baer vd., 2010).

JECFA (2007) araştırması, maruziyet tahminlerine göre vücut ağırlığının kilogramı başına yetişkinler ve küçük çocuklar tarafından tüketilen çeşitli gıda maddelerinde 3-MCPD içeriğini özetledi. Ortalama diyet maruziyetleri, soya sosu ve ortalama 3-MCPD konsantrasyonunun (8 mg / kg) en yüksek olduğu ilgili gıda maddeleri de dahil olmak üzere çok çeşitli gıdalar için vücut ağırlığının kilogramı başına 0.02 ila 0.7 µg arasında değişmektedir. Diğer tüketici grupları arasında en yüksek yüzde payı oluşturan küçük çocuklar için tahmin edilen maruziyetler, vücut ağırlığının kilogramı başına 0.06 ila 2.3 µg arasında değişmektedir. Chung ve diğ. (2008) ayrıca Hong Kong'da pazarlanan ve farklı gıda maddelerinden 318 numunenin analizine dayanan gıda maddelerindeki 3-MCPD konsantrasyonu hakkında genel bir rapor sunmuştur: 101 tip gıda, 3 ila 66 µg / kg arasındaki konsantrasyon aralığında 3-MCPD içeriyordu.

1.1.3.2 Yemeklik Sıvı ve Katı Yağlar

Hem endüstriyel işleme (tohum kavurma veya deoderizasyon dahil rafine etme işlemi) hem de ev tipi (kızartma) pişirme sırasında yüksek sıcaklıklarda işlenmesine rağmen bu gıda maddeleri grubu ayrı tutulur. Çoğu durumda, bazı gıda maddelerinin lipit fraksiyonları dahil olmak üzere sıvı ve katı yağlar, ör. keçi sütü (Rahn ve Yaylayan, 2011), patates kızartması, çörek veya tuzlu kraker (Hamlet vd., 2011), 3-MCPD'nin yağ asidi esterlerini içerir. 3-MCPD'nin bağlı formu, bu gıda grubunda ilk kez Gardner vd. (1983) kolza tohumu yağında (3800 µg / kg) hidroklorik asit varlığında tespit etmişlerdir. Yemeklik yağların diğer araştırmaları Zelinkova vd. (2006) tarafından 45 ham ve rafine yağ örneğini analiz etmişlerdir.

Konsantrasyonları <3 ve 24 µg / kg aralığında serbest 3-MCPD içeren yağlar, <100 µg / kg (saf yağlar) ile 2462 µg / kg (rafine zeytinyağları) arasında değişen miktarlarda çok daha yüksek bağlı 3-MCPD seviyeleri sergiledi. Bu bulgu, gıda endüstrisinin katı ve sıvı yağ sektörü üzerinde yoğun bir araştırma yapılmasını sağlamıştır. 2007 ve 2008 yıllarında, Stuttgart'taki Kimyasal ve Veteriner Test Kurumu (Alman Gıda Kontrol Ajansı) (ILSI, 2009) tarafından 400'den fazla farklı katı ve sıvı yağ numunesi analiz edildi ve neredeyse tüm rafine edilmiş katı ve sıvı yağlarda önemli miktarda bağlı 3-MCPD bulundu. En yüksek seviyeler (> 4000 µg / kg) palm yağlarında saplanırken, kızartma yağı ve margarin nispeten yüksek konsantrasyonlarda 3-MCPD esterleri içeriyordu. Kahve kreması, krem aerosol ve bulyon küplerinin yağ fraksiyonlarında büyük miktarlarda 3-MCPD esterleri (540-4840 µg / kg) belirlenmiştir (Karsulinova ve diğerleri, 2007). Patates kızartması ve patates cipsi gibi palmiye yağında kızartılarak hazırlanan gıda maddeleri de önemli miktarlarda 3-MCPD esterleri içeriyordu (Zelinkova vd., 2009'a).

Palm yağı rafinasyonunda, deoderizasyon adımı sırasında genellikle daha iyi bir renk, koku ve düşük yağ asidi içeriği için daha yüksek bir sıcaklığa ihtiyaç duyulur. Deoderizasyon işleminin 3-MCPD oluşumuna etkisi barizdir. Meyve yağları (zeytin ve palmiye yağları), nedeni hala net olmamakla birlikte tohum yağlarından daha fazla kontaminasyona eğilimli görünmektedir (bkz. Tablo 1.2). En yüksek MCPD seviyelerinin zeytin ve palm yağlarında bulunması sebebiyle Zelinková vd. (2006) rafine yemeklik yağlardaki diaçil gliserol içeriği ile MCPD seviyeleri arasında bir bağlantı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Tablo 1.2 Ham ve rafine bitkisel yağlarda tespit edilen 3-mpcd miktarları

Yağlar	No.	Ortalama (mg/kg)	Maksimum (mg/kg)	Kaynak
Ham çekirdek yağları	9	0.063	< 0.3	Zelinková vd., (2006)
Ham zeytin yağları	4	0.075	< 0.3	Zelinková vd., (2006)
Ham tohum yağları	2	0.1	< 0.3	Zelinková vd., (2006)
Rafine çekirdek yağları	5	0.524	1.234	Zelinková vd., (2006)
Rafine zeytin yağları	5	1.426	2.462	Zelinková vd., (2006)
Bitkisel katı-sıvı yağ karışımları	11	1.534	2.435	Seefelder vd., (2008)
Rafine palm yağı ve palm bazlı yağlar	12	3.24	5.8	WeiBhaar & Perz (2010)
Diğer rafine bitkisel yağlar	57	0.4–1.7		WeiBhaar & Perz (2010)

1.1.3.3 Bebek Mamaları ve Anne Sütü

Bu grup bebeklerin tüketimine yönelik gıdaları kapsar. Bebek mamalarının besinsel ve teknolojik özelliklerine ilişkin yüksek kalite gerekliliklerine uymak için, bitkisel katı ve sıvı yağların içerik olarak kullanılması esas olarak kabul edilir, bu nedenle önemli miktarda ester bağlı 3-MCPD riskini beraberinde getirir. Bebekler sık sık, bazen de sadece bu ürünlerle biberonla beslendiğinden, bu önemli bir sağlık riski olabilir.

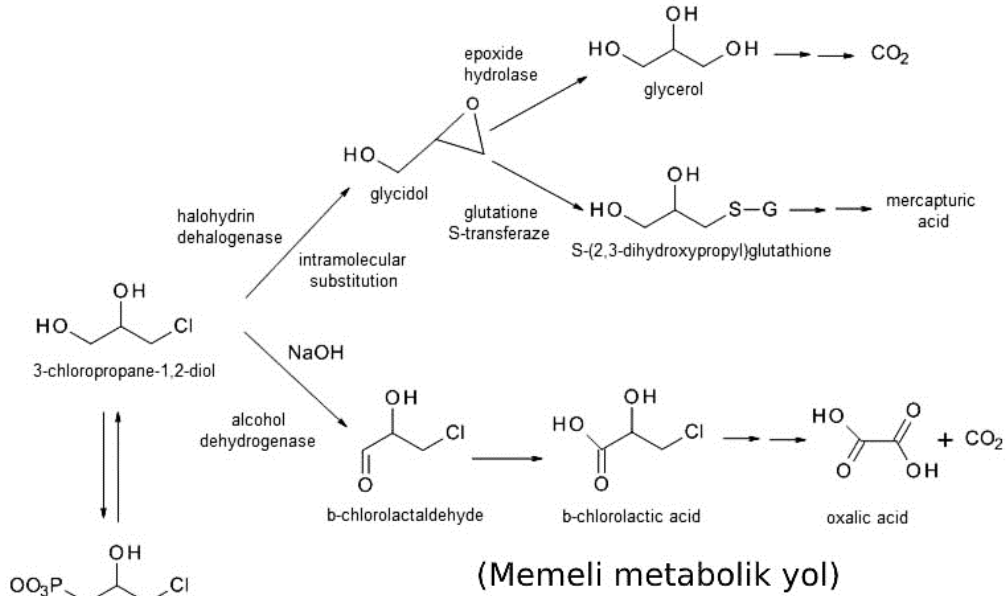
Diyete maruz kalma ile ilgili İnsan anne sütü, insan dokuları ve biyolojik sıvıları bakımından çeşitli bileşiklerin toksisite göstergesi olarak kullanılabilir. Velisek ve diğ. (2007) 12 anne sütü örneğini analiz etmiştir. Numunelerin hiçbirisi tespit sınırından (LOD) (3 µg / kg) daha yüksek konsantrasyonlarda serbest 3-MCPD içermemiştir; bununla birlikte, tüm numuneler önemli düzeyde esterleştirilmiş 3-MCPD içermekteydi. 3-MCPD'nin ortalama konsantrasyonu, 35.5 µg / kg süte karşılık gelen 1014 µg / kg izole yağ idi. Karşılaştırma için, doğumdan 14-76 gün sonra toplanan insan anne sütü örnekleri, 12 µg / kg süte karşılık gelen 930 µg / kg izole yağ içeriyordu. Bu sonuçlar, laktasyonun başlangıcında, kontamine yiyecekleri sindiren kadınlarda toksiklerle birlikte lipidlerin anne sütünün içine salgılandığını göstermektedir. Zelinkova ve diğ. (2009b), insan anne sütüne benzer bir bileşime sahip 14 bebek mama örneğini analiz etti. Numunelerin hiçbirisi önemli miktarda serbest 3-MCPD içermemiştir; ancak hepsinde yüksek düzeyde bağlı 3-MCPD saptanmıştır. Bağlı 3-MCPD'nin konsantrasyon seviyesi, <300-2060 µg / kg süte karşılık gelen 62-588 µg / kg izole yağdır. Belirlenen miktarlar her bir bebek mamasındaki yağ içeriği ile orantılıydı. Daha önce belirtildiği gibi, bu durumda tolere edilebilir günlük alım miktarı, bebeklerin vücut ağırlığının küçük olması ve sadece yukarıda açıklanan gıdaları tüketmesi nedeniyle kolayca aşılabılır. (Weisshaar, 2011; Zelinkova vd., 2008)

1.1.4 3-MCPD Absorbsiyonu, Metabolizması ve Toksisitesi

Kloropropanollerin absorpsiyonu, metabolizması ve kısa ve uzun süreli toksisitesi 70'lerden beri araştırılmıştır. Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalar, 3-MCPD'nin idrar yolu üzerinde zararlı etki ve doğurganlıkta azalma göstermiştir (Schilter vd., 2011). Ek olarak, in-vitro mutajenik aktivite gözlemlendi; ancak in vivo çalışmalar bu bulguyu doğrulamamıştır. İnsanlarda klinik çalışmalar bildirilmemiştir (JECFA, 2002). 3-MCPD ve metabolitlerinin emilimi, atılımı ve biyotransformasyonu hakkında yapılan çalışmalarda Edwards vd. (1975), 3-MCPD'nin vücut sıvılarında dağıtıldığını ve emildiğini iddia ederken, Jones vd. (1978), 3-MCPD'nin veya metabolitlerinin dokularda

birikmesini doğrulamamıştır. Bununla birlikte, 3-kloro-1,2-propandiol başlangıç dozunun yaklaşık %30'unun β -klorolaktat (3-MCPD metaboliti) olarak geri kazanıldığını bildirmiştir.

Jones (1978), 3-MCPD'nin metabolik yollarını iki farklı yolla açıklamıştır (Şekil 3). Bakteriyel yol (*Pseudomonas* ve *Arthrobacter* üzerinde test edilmiştir) glisidol (genotoksik bileşik) ile gliserol veya merkapturik aside gelişir. Sıçanlarda, farelerde ve diğer memelilerde *in vivo* bulunan metabolitler, bakterilerde tanımlananlardan farklıdır. Sıçanlar üzerindeki toksik etkiler, testiküler ve böbrek toksisitelerine neden olan β -klorolaktaaldehit ve β -klorolaktik asit ile ilişkilidir (Jedrkiewicz vd., 2016). Bu etkiler, β -klorolaktaaldehit tarafından glikolize karışan enzimlerin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Jones ve Porter, 1995). Ayrıca, β -klorolaktik asidin bir metaboliti olan oksalik asit, böbrek sistemi üzerinde bir etkiye sahiptir (Bakhiya vd., 2011). Sıçanlarda nefrofati ve spermatosel oluşumu benzer bir mekanizma ile ilişkilidir, çünkü hem böbrekler hem de epididim aynı embriyonik kökene sahiptir (Jones, 1983).



Şekil 1.3 3-MCPD'nin bakteriyel ve memeli metabolik yolu

3-MCPD'nin kemirgenlerde kısa süreli bir maruziyetten sonra (dört hafta) böbrek en çok etkilenen organdı. Tek bir intraperitoneal 3-MCPD dozu, Sprague – Dawley sıçanlarında (Jones vd., 1978) akut glomerüler nefrite ve Wistar sıçanlarında (Morris ve Williams, 1980) ciddi proteinüriye neden oldu. Ayrıca, böbrek ağırlığında bir artış gözlenmiştir (Cho vd., 2008).

Kemirgenlerin yanı sıra, 3-MCPD'nin kısa süreli toksisitesi üzerine bazı araştırmalar primatlarda da gerçekleştirilmiştir (Kirton vd., 1970). Altı haftalık bir çalışmadan sonra anemi, lökopeni ve trombositopeni ile kendini gösteren kemik iliği üzerinde zararlı bir etki gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu toksikolojik etkiler daha kapsamlı ve ayrıntılı olarak araştırılmamıştır.

Fare ve sıçanlarda uzun süreli toksisite (karsinogenisite) üzerine yapılan araştırmalar, 3-MCPD alımından sonra tümörlerin varlığını göstermedi (Van Duuren vd., 1974). 3-MCPD kanserojen etkisi ile ilgili çeşitli biyolojik deneyler yapıldı. Çatışan veriler olarak; Jayoung vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada içme suyuna eklenen 3-MCPD, B6C3F1 sıçanlarında kanserojen bir etki göstermemiştir. Ayrıca El Ramy vd. (2006), 3-MCPD'ye maruz kaldıktan sonra sıçan testiküler organogenezinde herhangi bir olumsuz etki gözlemlememişlerdir.

3-MCPD'nin potansiyel genotoksisitesi birçok soruyu gündeme getirmektedir. Bakterilerde, bileşik pozitif bir mutajenik etki sergilemektedir (Silhankova, 1982). Genel olarak, faredeki gen mutasyon testi de dahil olmak üzere memeli hücreleri üzerinde yapılan testler de pozitif olarak sonuçlanmıştır (Jedrkievicz vd.,2016). Bununla birlikte, 3-MCPD'nin genotoksik olmayan mekanizmalar yoluyla tümörlere neden olduğuna inanılmaktadır (Jones, 1978).

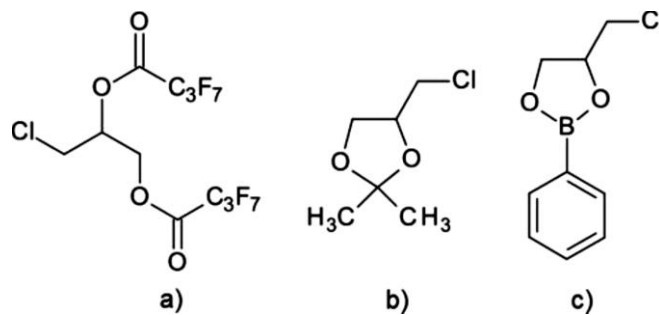
1.1.5 Gıda Örneklerinde 3-MCPD'in Belirlenmesi İçin Kullanılan Analitik Prosedürler

Karmaşık matris kompozisyonu ve 3-MCPD ile benzer fizikokimyasal özellikler sergileyen bileşiklerin varlığı ile karakterize edilen gıda örneklerinde 3-MCPD'nin eser ve hatta ultra eser seviyelerinin belirlenmesi, analitik kimyacılar için büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Ek olarak, kromofor eksikliği, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ultraviyole veya floresan tespiti uygulamasını elemektedir. Bileşiğin hem yüksek bir kaynama noktası hem de düşük moleküler ağırlığa sahip olması, gaz kromatografisini ve kütle spektrometresi (GC-MS) analizi uygulamalarını da olumsuz etkilemektedir (Baer vd., 2010).

1978'de Velisek vd. ilk defa silika jel kolon ayrımı ve nükleer manyetik rezonans kullanılarak 3-MCPD belirlemişlerdir. Daha sonra GC-MS yöntemleri araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak uygulandı. Bununla birlikte, örnek matris bileşimi nedeniyle, 3-MCPD ve GC bileşenleri veya matristeki bileşikler arasındaki etkileşimleri önlemek için örnek hazırlama ve türevlendirme gerekti.

Şu anda, Avrupa Komisyonu tarafından onaylanmış hiçbir analitik prosedür yoktur, ancak uzmanlar kabul edilebilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamak için kriterler belirlemiştir, örnek alan boşlukları, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve hassasiyet vb. (Avrupa Komisyonu Yönetmeliği, 2007).

GC-MS ile analiz edilen numuneler durumunda, numune hazırlamadaki en önemli adımlar asit veya alkalın transesterifikasyon reaksiyonu (esterleştirilmiş formundan serbest 3-MCPD'nin serbest bırakılması için), türevlendirme reaksiyonu (GC tarafından belirlenecek uçucu türevi elde etmek amacıyla) ve bir türevinin ekstraksiyonudur. 3-MCPD'nin belirlenmesi için kullanılan ilk türevlendirme maddesi heptaflorobutirilimidazol (HFBI); diollerle reaksiyonu di (heptafloro) butirat ile sonuçlanır (Hamlet ve Sutton, 1997) (Şekil 1.4). Bununla birlikte, Retho ve Blanchard (2005), HFBI ile türevlendirme reaksiyonunun zayıf seçicilik sergilediğini, çünkü HFBI'nin nükleofilik moleküller ile reaksiyona girebileceğini öne sürmüştür. Elde edilen türevin kütle spektrumu, spesifik iyonlar için karakteristik bölgesinde yetersiz (eksik) türevlendirmeyi gösterebilen düşük yoğunluklu bir sinyal gösterir. İmidazol formu yerine heptaflorobütirik asit anhidrit (HFBA) kullanılabilir (Xu vd. 2006). En yaygın olarak kullanılan türevlendirme maddesi, diollerle reaksiyonu dioksaborolan türevleri ile sonuçlanan fenilboronik asittir (PBA) (Divinov vd., 2004) (Şekil 1.4). Ek olarak, türetici bir ajan ve reaksiyon çözücüsü olarak aseton (Şekil 1.4) kullanılan yöntemler vardır (reaksiyon sonuçları dioksolanlarla sonuçlanır), ancak sonuçta elde edilen ekstrakttaki birçok istenmeyen madde nedeniyle yaygın olarak uygulanmamıştır (Maierhans ve diğerleri, 1998). Son zamanlarda, türevlendirme maddesi olarak N, O-bis (trimetilsilil) trifloroasetamid (BSTFA) kullanımı da rapor edilmiştir (Racamonde vd., 2011).



Şekil 1.4 3-MCPD'nin Türevlendirme reaksiyon ürünleri: (a) HFBI; (b) PBA ve (c) Aseton (Racamonde vd., 2011).

GC-MS yöntemleri kullanılarak 3-MCPD'nin belirlenmesi için analitik prosedürler on yıldan uzun bir süredir modifiye edilmiştir. Günümüzde, bu tür değiştirilmiş iki prosedür kalite kontrol laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft) yöntemi (2011) ve "Referans Malzemeleri ve Ölçüm Enstitüsü Ortak Araştırma Merkezi" (JRC IRMM) tarafından önerilen yöntem, 3-MCPD'nin serbest ve bağlı formlarda dolaylı olarak belirlenmesini sağlar (Karasek vd., 2010). Bununla birlikte, bazı araştırmalar (Karasek vd., 2011; Kaze vd., 2011) alkalın koşullarının glisidolün 3-MCPD'ye kısmi dönüşümüne neden olduğunu kanıtladığı için, güvenilirlikleri açısından sorgulanabilir. Bu nedenle tespitin nihai sonucu, başlangıç numunesinde bulunmayan 3-MCPD'yi içerir. Bu sorunun çözümü, glisidil esterlerin analiz sırasında 3-MCPD esterleriyle etkileşime girmediği asit transesterifikasyonunun uygulanması olabilir (Ermacora ve Hrnčirik, 2012). Bununla birlikte, transesterifikasyon aşaması (4-16 saat) nedeniyle yöntemin zaman alıcı olduğu düşünülmektedir (Hrnčirik vd., 2011).

GC yöntemlerinin yanı sıra, uçuş zamanı kütle spektrometrisi (LC-TOFMS) ile sıvı kromatografisi kullanılarak bir prosedür de geliştirilmiştir. Bu yöntem basit, zaman alıcı değil ve analit dönüşümünün herhangi bir ek adımı olmaması nedeniyle doğrudan bir tekniktir. Bununla birlikte, mobil fazda sodyum bulunması nedeniyle MS sistemine verilen hasarla ilişkili yüksek maliyetler nedeniyle endüstriyel laboratuvarlarda rutin analizlerde yaygın olarak uygulanmamıştır. Ayrıca, gıda örnekleri (örn. Yağlar) gibi karmaşık matrisler cihazı kirletir, kullanımdan önce günlük olarak temizlenmesi gerekir. Ek olarak, nebulizatör iğnesi, paslanma ve ESI cihazının bileşenleri haftalık olarak değiştirilmelidir ve bu da genel maliyetleri artırır (ortalama koşullar altında, parçalar bir yıllık sürekli kullanımdan sonra değiştirilir) (Haines vd., 2011).

GC-MS yöntemlerinin, güvenilirlik ve tekrarlanabilirliği şüpheli olmasına rağmen, günümüzde 3-MCPD'nin analitiğine hâkim olduğu görülmektedir. Dispersiyon mikro ekstraksiyonu ve ardından GC-MS, süperkritik sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi ve sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi gibi sofistike ve dolayısıyla pahalı ekipman kullanarak 3-MCPD tayini için çeşitli yöntemler de vardır. Ancak, şimdiye kadar laboratuvarlarda yaygın bir uygulama alanı bulamadılar.

Mevcut yeni yöntemler için, istenmeyen reaksiyonlardan ve dönüşümlerden kaçınmak için numune hazırlama sırasındaki karmaşık işlemlerin ve yeşil kimyanın ilkelerine uygun olarak sıvı ekstraksiyonu adımının ortadan kaldırılması üzerinde durulmaktadır.

Bu amaçlara GC analizi ile kombine edilmiş headspace türevleştirilmesi ve katı faz mikro ekstraksiyonu (HS-SPME) kullanılması sağlanabilir (Huang vd., 2005; Maw-Rong vd., 2007). Yayınlanan yöntemler, soya soslarını analiz etmek için başarıyla uygulanmıştır ve bu nedenle diğer gıda örneklerine ilişkin umut vericidir. Analitik yaklaşım aşağıdaki gibidir: 3-MCPD ilk önce PBA veya N-metil-N- (trimetilsilil) -trifloroasetamid (MSTFA) ile türevlendirilir, daha sonra HS-SPME ile ekstrakte edilir ve son olarak GC-MS ile tespit edilir. Ayrıca, su örneklerinde kloropropanoller (1,3-DCP ve 3-MCPD) belirlemek için GC-MS ile birleştirilmiş bir katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır (Gonzalez vd., 2011). Çevre dostu olmanın yanı sıra, yukarıdaki yöntemler daha basit ve daha hızlıdır ve bu nedenle rutin analiz için daha uygundur.

1.1.6 Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi

Bir NIR spektroskopisi cihazına genel olarak baktığımız zaman; ışık ayırıcı sistem, örnek detektörü, ışık kaynağı, optik detektör ve elde edilen sonuçları kaydeden analiz unsurlarından oluşmaktadır. NIR spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun 780-2500 nm dalga boyu aralığında ışımının absorplanması prensibi ile çalışmaktadır. İlgili alanda numune ile yakın kızılötesi ışınlar işleme girdiği zaman analzi edilen numunenin içeriğinde mevcut olan O-H, C-H, C-O ve N-H gibi moleküler bağlarda titreşim oluşmaktadır. Bu bağlar, NIR bölgesinde yüksek frekanslı overtone ve kombine bantlar halinde belirlenebilmektedir. NIR spektroskopisi tarım ve gıda ürünlerinde hem nitel hem de nicel analiz için kullanılmaktadır. NIR spektroskopisi yığın haldeki örneklerin çalışılmasına büyük olanak sağlamakta ve kullanımının kolay olmasından dolayı endüstriyel kurulumu uygundur. NIR spektroskopisi kullanılarak yapılan ölçümlerde, en önemli husus, ölçümü yapılan üründe genelde herhangi bir hasar olmamasıdır. Bazı durumlarda, spektral ölçümlerden önce ürün bir ön işleme tabi tutulabilir; örneğin buğdayın öğütülmesi gibi. Bununla birlikte NIR spektroskopinin ürünlerin kalite kontrolünde kullanılması son derece ümit vericidir. Ayrıca bu tekniğin başarısı yazılım ve donanım ile hızlı bir şekilde geliştirilmiştir. (Blanco & Villarroya, 2002; Cen & He, 2007; Çağlar vd., 2019; Ertugay & Baslar, 2011; Newgard, 2004; Osborne vd., 1993;)

Avantajları:

-Ölçümü kolay ve oldukça hızlı sonuç verir. Analiz sonuçlarına birkaç dakikada ulaşılabilir.

-Numuneye ait yağ, protein, nem benzeri unsurlarının tespitinin yanı sıra duyuşal ve kalite analizleri aynı zamanda beraberce belirleyebilmektedir.

-Analiz için çok az bir numuneye ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak; numuneyi zedelediğı için örneğın diğeri analizlerde kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

-Analiz süresince kimyasal madde kullanımına gerek duyulmadığı için tehlikeli bir unsur içermemektedir. İlaveten, kimyasal kullanımı olmadığı için artık da ortaya çıkmamaktadır. Bu unsurları göz önüne aldığımız zaman çevresel unsurlar içinde pozitif bir kazanımdır.

-Genel kabul görmüş prosedürlerde olduğu gibi tüm analizler için özelleştirilmiş aletlere veya ekipmanlara ya da diğeri laboratuvar içinde kullanılacak malzemelerine gerek bulunmamaktadır. Bu bakımdan incelendiğinde; işletim unsurları ve buna paralel olarak kullanım maliyeti öteki uygulamalarla karşılaştırıldığında oldukça avantajlıdır.

Dezavantajları:

-Cihazın genel fiyatı yüksektir. Ancak genel kabul görmüş prosedürlerin uygulanması için kullanılacak cihazların fiyatlarından fazlada değildir.

-Analizin uygulanabilmesi için kalibrasyon ihtiyacı bulunmaktadır. Ancak bu kalibrasyon yöntemlerini oturtturmak kolay olamamakla birlikte, bu yöntemlerin geliştirilmesi için süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlara paralel olarak; kalibrasyonun oluşturulabilmesi için referans yöntem olan klasik metotlara da ihtiyaç duymaktadır.

-Yöntem genel olarak bakıldığı zaman büyük yapıların tespitinde uygulanmaktadır. Küçük yapılarda ve belirli kalite niteliklerinde tespit limitlerinde azalma olabilmektedir.

-NIR cihazları arasındaki optik farklılıklardan kaynaklı olarak kalibrasyon şekillerinin ve yöntemlerinin başka bir NIR cihazına aktarımı zaman zaman uygun olmamaktadır.

Enstrümantasyon gelişimi ile birlikte, analitik yöntemler ve yazılımlar; matematiksel ve kemometrik teknikler kullanarak veri arşivleme ve yorumlama daha kolay ve hızlı bir biçimde yapılmaktadır.

Böylece hem enstrümentasyonun hem de analitik yazılımların NIR spektroskopisi için geliştirilmesi bu yöntemi güvenilir, etkili ve endüstride kalite kontrol için kullanılabilecek standart bir yöntem haline getirmiştir (Blanco & Villarroya, 2002).

NIR spektrofotometreleri 3 enstrümental cihaz ile kategorize edilir;

- Sıralı cihazlar, absorbans sırayla zamanında toplanır ve cihaz monokromatör veya filtreler ile donatılmıştır.
- Fourier dönüşümü veya multipleks cihazlar ile kombine edilmiş NIR spektrofotometreleri, bu cihazlarda birçok frekansta eş zamanlı olarak çalışabilir.
- Çok kanallı cihazlar, bunlarda çeşitli dalga boylarında çeşitli dedektörler vasıtası ile absorbanslar ayrı ayrı tespit edilebilmektedir.

NIR spektroskopisinde farklı spektral modlar, örneğin hem dış hem de iç özelliklerinin tahmin edilmesine imkân sağlamaktadır. Bu modlar yansıma, iletim, interaktans, transflektans içermeaktadır. Yansıma ve interaktans genellikle katıların spektrumu, iletim sıvıların spektrumu ve transflektans ise ince ya da temiz örneklerin spektrumlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır. Uygulanan modlar örneğin tipi, fiziksel özellikleri ve karakteristiğine bağlıdır.

Yansıtma modu spektroskopisi yansıyan ya da numune yüzeyinden saçılan ışığı ölçer. Pürüzsüz yüzeye gelen ışık aynı açıyı yaparak yansır fakat pürüzlü yüzeye gelen ışık dağınık (Bajcsy vd., 1996). Pürüzsüz yüzeydeki yansıma numune kompozisyonu hakkında çok az bilgi içermektedir. Dağınık yansıma, bir numunenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin analizi için daha uygundur. Gıda maddelerinin fiziksel özellikleri ve karakteristikleri ile uyumluluk gösteren bu mod gıda endüstrisinde büyük ilgi görmüştür. Son on yılda, dağınık yansıma NIR tekniği kullanılarak, çeşitli gıdalarda yağış tespiti üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Farklı et örneği türlerini ayırt etmek amacıyla yürütülen çeşitli çalışmalar yüksek sınıflandırma doğruluğu ile sonuçlanmıştır (Alander vd., 2013) Bu teknik, süt tozunda ve soya fasulyesinde melamin tespitinde ve yoğurtta protein yağışında başarılı bir şekilde uygulanmıştır. NIR yansıma spektrumları portakal suyunda 1100-2498 nm dalga boyu aralığında %90 doğrulukla, %10 portakal pulp yıkama ve sentetik şeker-asit karışımını tespit etmek için basit ve pratik bir yöntem sunmaktadır (Twomey vd., 1995). Elma, çilek ve ahududu püresi yağışı yansımali NIR spektroskopisi kullanılarak tespit edilebilir (Contal vd., 2002).

NIR spektroskopisi iletim modu bir numunenin hem dış hem de iç kalitesini belirlemek amacıyla kullanılabilir, bu modda ışık numune boyunca ilerleyerek numunenin iç kalitesi hakkında bilgi verir. Bu teknik, katı, sıvı ve gaz örneklerinin analizi için kullanılabilir. Bu mod kullanılarak, yağ (Sinelli vd., 2010) ve meyve sularında (Xie vd., 2008) doğrulama ve taşıyıcı tespiti yapılmış, beyaz şarap örnekleri için tür tanımlaması yapılmış (Cozzolino & Murray, 2003), sığır ve tavuk yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir (Riovanto vd., 2012; Sierra vd., 2008).

NIR spektroskopisi interaktans modu yansıtma ve iletim modlarının kombine edilmiş şeklidir. Bazı durumlarda, iletim modu ölçüm için yeterli olmadığı zaman interaktans numunenin iç özelliklerini öğrenmek için uygun bir yöntemdir.

Transfleksiyon iletim ve yansıtma modları kombinasyonu olup, özellikle ince veya temiz numunelerin spektrum ölçümü için tasarlanmıştır. Transfleksiyon yansıtma ve iletim modları gibi yaygın değildir; fakat optik demet probu bu moda bağlı olarak sıvı akıntı analizleri için başarıyla uygulanabilmektedir (Pasquini, 2003).

NIR spektrometrelerinden elde edilen bir spektrumda, numuneyi belirlemek veya gruplandırmak için uygulanacak birçok kimyasal ve fiziksel data içermektedir. Fakat NIR spektrumlarındaki overtonların birbirleri arasında çakışması ve sıklıkla yaygın bir içeriğe sahip olmasından kaynaklı bu unsurların numunedeki kimyasal bantlar ile anlamlı ilişkiler kurulması problemli olabilmektedir. NIR spektroskopisi ile spektrumlardaki bilgileri yorumlamak, elde edilen sonuçlardan tespit etmek imkânı bulunduğu kadar mevcut sonuçların meydana gelmesinde uygulanan istatistiksel ve matematiksel yöntemler kemometri olarak adlandırılmaktadır (Nicolai vd., 2007).

Yakın kızılötesi spektroskopisinin kalibrasyon yöntemi oluşturmak zaman alan ve meşakkatli olmasının yanı sıra birçok analizi aynı anda yapabilmesi, çok hızlı sonuç alınabilmesi, birden fazla unsuru ve kalite niteliklerinin tespitini paralel zamanlarda çok kısa sürelerde analizler yapabilmesi gibi önemli avantajları vardır. Tespit edilen unsurların referans metotlara ihtiyaç duyduğu için hassas kalibrasyon yöntemlerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Özellikle son günlerde NIR metotlarında kemometriyle iç içe geçiren birçok kalibrasyon uygulaması geliştirilmiştir. Adımsal çoklu lineer regresyon (SMLR), temel bileşen regresyonu (PCR), kısmi en az kareler (PSL) ve yapay nöral ağ (ANN) kaynaklarda dikkat çeken en önemli tespit yöntemleridir (Cen & He, 2007; Aske vd., 2001; Ni vd., 2005).

1.1.6.1 NIR Spektroskopisi ile Yapılmış Gıda Analiz Çalışmaları

NIR spektroskopisi değişik birçok sektörde karşılaşılan problemlere çözüm sunmak niyetiyle uzun zamandır uygulanmakta olan bir metot olarak adlandırılmaktadır. NIR spektroskopisinin uygulandığı konulara emsal olarak kimya endüstrisi, polimer endüstrisi biyomedikal bilimler, gıda ve ziraat analizler gibi konular verilebilir. (Burns & Ciurczak ,2007; Siesler vd., 2008). Gıda sektöründe NIR spektroskopisi ile yapılan uygulamalar incelendiği zaman tahıl ve tahıl ürünleri, süt ve süt ürünleri, et, sebze, balık, meyve ve içecekler gibi hemen hemen tüm gıda sektörünü ele alan uygulamalar mevcuttur. Literatür tarandığı zaman NIR ile yapılan uygulamalar gıdanın içeriğindeki kalite unsurlarının, gıda kaynağının, gıdaya uygulanan taklit ve taşıyıcıların belirlenmesi noktasına odaklanıldığı görülmektedir. NIR spektroskopisinin en yaygın uygulandığı gıda konusu olan tahıl ve tahıl ürünleri içinde uygulanan analizlerde en kapmalı kısmı hububat ürünlerinin kalitesinin tespiti için kullanılan protein ve nem analizleri başı çekmektedir .Şimdiye kadar yapılmış uygulamalar incelendiği zaman buğday için geliştirilen protein, sertlik ve analizleriyle beraber kitledeki nem ve protein değerlerine ait kalibrasyon yöntemlerinde oldukça yetkin, sektörel olarak yaygın olarak kullanılabilir, faydalı sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Mutlu vd., 2011; Osborne, 2006). NIR spektroskopisinin yaygın olarak uygun alanı bulduğu bir diğer konu ise süt ve süt sektörüdür. Isıl işlem görmüş, çiğ ya da sütte, kremada, süt tozunda veya değişik peynir çeşitlerinde kalite unsurları olarak değerlendirilen yağ, protein, nem ve laktoz seviyesinin NIR spektroskopisinin değişik analiz modları ile etkili bir şekilde tespit edildiği uygulamalar bulunmaktadır (de la Roza-Delgado vd., 2017; Chen vd., 2018). NIR spektroskopisi sığır, hindi, koyun, keçi ve domuz gibi etlerin nem, protein ve yağ seviyelerinin tespiti, yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, kıymanın orijininin bulunması ve hayvan etlerinin yağ oksidasyonunun belirlenmesi gibi birçok alanda uygulanmaktadır (Balage vd., 2015; Ripoll vd., 2018).

1.1.6.2 Veri İşleme Teknikleri ve Kemometrik Yöntemler

Spektroskopi konusunda uygulanan kemometrik yöntemler yaygın ifadesiyle nitel ve nicel ölçüm yöntemleri olarak iki ayrı sınıfta değerlendirilmektedir. Nitel niyetlerle inkişaf edilen uygulamalarda ana unsur metodu, diskriminant analiz ve kısmi en küçük kareler yöntemi-diskriminant analizi gibi yöntemler misal olarak gösterilebilirken, kantitatif niyetli olarak uygulanan yöntemler olarak kısmi en küçük kareler yöntemi, çoklu doğrusal regresyon (multiple lineer regression, MLR), yapay sinir ağları

(Artificial Neural Networks, ANN), temel bileşen regresyon (Principal component regression, PCR) ifade edilmektedir (Roberts vd., 2016). Bu uygulamaların öncelikli niyeti spektral sonuçtaki çok fazla bulunan değişken sayısını verilerin iç yapısını en iyi ifade eden dataları kapsayan mümkün olduğu kadar en az sayıdaki temel unsurlara indirmektir. Sonrasında gruplandırma niyetli uygulanan yöntemler birbirine ortak verileri eşit grupta toplayarak birbirinden ayırmakta, regresyon niyeti ile kullanılan yöntemler ise tepit edilen sonuçları numunedeki tespit edilmek niyetindeki değerler doğrusal bir şekilde birleştirmektedir (Nunes, 2014).

1.1.6.3 Ön İşlem Teknikleri

Rastgele seçilen spektrometreden çekilen sonuç grafikleri ile belirlenen değer arasında bir bağlantı belirlenmek istenildiği zaman, istatistiksel yöntemler uygulamadan önce spektrumlara çeşitli ön işlemler yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. NIR cihazında elektromanyetik radyasyon dalga boylarının büyüklüğü ve numunelerde parça büyüklüğü nedeniyle elde edilen örnek sonuçları değiştirecek istenmeyen dağılma etkilerini geri plan kalabalığı ve düzlemde dalgalanmalar görünebilmektedir (Rinnan vd., 2009). Spektrumda görünen fakat talep edilmeyen özellikler nedeniyle kalibrasyon yönteminin oluşturulması sonrasında doğru olmayan veriler elde edilebilmektedir. Bu sebeple NIR sonuçları ile uğraşırken birinci olarak pre-step işleme ihtiyaç duyulup duyulmadığı noktasında bir inceleme yapılması, uygulama yapılacak ise ne çeşit pre-step yöntem en doğru olduğunun tespit edilmesi, yöntem oturturma basamağında çok fazla öneme sahiptir (Puzarro vd., 2004). Spektrumu elde edilecek numunelerin bazılarının fiziksel özelliklerinden kaynaklı olarak tekrarlanabilir yapısal form oluşturulamamakta, bu durum da tekrarlanabilir spektrumların elde edilmesine mâni olmaktadır. Özellikle partikül yapıda bulunan katı numunelerde spektrometreden yayılan ışığın fazla ve amaçlanmayan yönlerde saçılmasından kaynaklı detektöre ulaşan anlamlı sinyalde kayıplar gözlenebilmektedir. Bu ön işlemlerden standart normal değişken (standart normal variate (SNV)), de-trend ve çoğaltıcı saçılma düzeltme (Multiplicative Scatter Correction (MSC)) gibi normalizasyon ön basamakları, bu fiziksel formdan kaynaklanan problemin çözülmesi için spektrumlara uygulanmaktadır.

Yumuşatma (smoothing), 1. ve 2. türev, boşluk-segment türev uygulama gibi ön basamlar ise spektrumda meydana gelen gürültüyü ve spektrumlar arasındaki kaymayı minimize etmek ve arka plan etkilerini silmek niyetiyle spektrumlara uygulanmaktadır.

Bu ön basamaklardan SNV, granüler ya da toz formadaki numunelerin örnek hücresi içerisinde tekrarlanabilir yapıda bırakılmasından ve bu sebeple tekrarlanabilir spektrum elde edilememesinden veya partikül büyüklüğünün değişiminden dolayı spektrum üzerindeki farklılaşmaların uzaklaştırılması için uygulanmaktadır. Bu ön basamak, spektrumdaki bütün verilerden spektrumun ortalaması çıkarıldıktan sonra spektrumun standart sapmasına bölünmesi ile meydana gelmektedir. Barnes ve ark. tarafından geliştirilen çalışmada ve yine katı partiküllü numunelerin spektrumlarındaki temel hat kaymasını onaran öteki yöntem olan de-trend yöntemi ise temel hat eğriliğini, dalga boyunun kuadratik bir fonksiyonu olarak ifade edilmekte ve spektrumdan silmektedir (Barnes vd., 1989).

1.1.6.4 Klasifikasyon ve Regresyon Yöntemleri

Kalitatif spektrum yönteminde en fazla uygulanan PCA metodunun temelinde büyük veri setinde bulunan bilgileri daha kolay yöntemlerle ifade etmek ve mevcut çok sayıda değişkeni daha az sayıda anlamlı doğrusal yapıdaki temel bileşenlerine indirmek niyeti bulunmaktadır. PCA analizi ile veri setinde mevcut olan numuneye ait bilgi saklanırken, çok fazla bulunan birbiriyle ilişkili değişkenlerin sayısı etkin bir şekilde azaltılmaktadır. Bu şekilde yeni oluşturulan değişken kümesi, spektrumun kendisiyle doğrusallık göstermekte ve spektrumda mevcut olan bilgiyi daha az veriyle kaynak oluşturabilmektedir. Gruplandırmak niyetiyle uygulanan bir diğer uygulama olan kısmi en küçük kareler diskriminant analizi ise PLS temelli veri azaltma ve sınıflandırma yöntemidir. PLSDA yönteminde standart PLS algoritmasından faydalanılmakta, fakat bağımlı y değişkeni için tahmin edilmesi istenilen örneğe ait özellik yerine 0 ve 1 gibi sınıfı temsil eden rakamlar ifade edilmektedir. İki'den fazla sınıfın ifade edilmek istendiği durumlarda PLS2 algoritması uygulanmaktadır. PLS modeli sistemde kullanıldığında her bir numune için Y_{tahmin} değeri bulunmaktadır. Numunenin hangi sınıfta olduğu ise Y_{tahmin} değerinin önceden adlandırılan Y1 ya da Y0 değerlerinden birine olan yakınlığıyla ifade edilmektedir. Buradaki Y_{tahmin} değerleri ile beraber Bayes teoremi kullanılarak bir eşik limiti (EL) sınırlı değeri bulunmakta ve bu değer üzerinde kalanlar 0 sınıfı, altında kalanlar ise 1 sınıfı olarak ifade edilmektedir. Birden fazla sınıf tek bir modelde ifade edilmek istenildiğinde ise grup sayısı kadar eşik limiti değeri bulunmakta ve ayrı ayrı gruplandırılarak tek modelde sunulmaktadır (Westerhuis vd.,2008; Rodionova vd., 2016; Gondim vd., 2011)

Regresyon yöntemi olarak spektroskopi metotlarda en sık uygulana çok değişkenli kalibrasyon metotlarından olan PLS, bağımsız değişkenlerin (spektrum) bağımlı değişkenler ile (örnek özelliği) ilişkilendirilmesini gizli değişkenler yardımıyla yapabilen analiz metodu olarak ifade edilmektedir. Uygulamanın niyeti spektral değerleri imkân olduğunca etkin kullanarak numune özelliklerini tahmin edebilen bağımsız değişkendeki varyasyonlardan çok daha az sayıda gizli değişken (gizli faktör) oluşturabilmektir (Wold vd., 2001).

1.1.7 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Organik veya inorganik yapıların tespitini kullanan pratik bir cihaz olarak önemli faydaları olan Kızılötesi (IR) spektroskopisi gün geçtikçe kullanım alanları artmaktadır (Ono vd., 2011). Numuneye özel, kişiselleştiren sonuçlar vermektedir. Bu bilgileri sağlarken maddeyi meydana getiren atomlar arasındaki bağların titreşmesi nedeniyle meydana gelen frekanslarına uygun gelen absorpsiyon çizgileri ile yapılan hesaplamalar sayesinde gerçekleşmektedir (Lin & Wang, 2011).

Birçok sektörde kullanım alanları mevcuttur. Özellikle süt sektörü gibi klasik yöntemlerin kullanıldığı ve enstrümantal cihazların varlığında yapılan analizlerin ağırlıkta olduğu alanlarda zaman kazandırması ve işletim maliyetinin uygun olması açısından önemli avantajlar sağlamaktadır (Delaunay vd., 2011). Sıvı ve katı yağ sektöründe de yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle yağların birbiri ile karıştırılması sonucunda yapılan taşıması belirlemede %98'e varan etkin sonuçlar alındı raporlanmıştır (Gürdeniz, Tokatlı ve Özen, 2008). Benzer birçok gıda, kimya sektörlerinde yaygın olarak kullanımı mevcuttur. Ekstrem bir örnek olarak biyoteknoloji alanlarında da çok başarılı, etkin sonuçlar alındığı ifade edilmektedir. Değişik elektriksel yükleri içeren alanlarda DNA da meydana gelen yapısal farklılıkların tespitinde de kullanım alanları bulmaktadır (Abu-Teir vd., 2008).

1.1.8 Kabak Çekirdeği ve Yağı

Kabak, Cucurbitaceae familyasının alt türleri içinde bulunan, birçok alanda yetiştirilen, elde edilen meyveleri ve tohumları sıklıkla insanlar tarafından kullanılan önemli bir gıda ürünüdür. Zengin ve çeşitli bir mineral içeriğine sahip olan kabak, özellikle potasyum, magnezyum, fosfor, kalsiyum, demir, sodyum mineralleri içermesi ile dikkat çekmektedir. Kabak birçok türü olmasına rağmen en yaygın olan türleri; balkabağı (*Cucurbita moschata*), sakızkabağı ve helvacıkabağı (*Cucurbita maxima*) dır (Nederal vd., 2014).

Balkabağı (*Cucurbita* sp.) dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yetişen yıllık bir bitkidir(Tadmor, Paris, Meir, Schaffer& Lewinsohn, 2006) . Özellikle tohum bileşimi nedeniyle değerli bir diyet bileşeni olarak kabul edilir(Nawirska-Olszańska, Kita, Biesiada, Sokół-Łęptowska, & Kucharska, 2013). Kabak çekirdeği, son yıllarda çeşitli nutrasötik özelliklere sahip oldukça zengin biyoaktif bileşikler içermesi nedeniyle önemli ölçüde ilgi gördü. Doğal biyoaktif bileşiklerle kabak çekirdeği, in vivo deneylerde gösterildiği gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahiptir (Dyshlyuk ve ark., 2017).

Kabak çekirdeğinin ana bileşeni toplam içeriğin %50'sini oluşturan yağ olduğundan, tohumlar bitkisel yağ üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Son birkaç yılda, çeşitli çalışmalar kabak çekirdeği yağının hipertansiyon, diyabet ve kanser gibi birçok hastalığa karşı sağlık etkilerini belirtmektedir (Montesano, Blasi, Simonetti, Santini, &ssignani, 2018).

Kabak çekirdeği yağı tohumu yağı%73-80, esas olarak linoleik (% 36-61) ve oleik asitler (% 21-47) içeriğine sahiptir. Kabak çekirdeği yağının bu doymamış yağ asidi bileşimi, gıdaların besinsel faydalarını iyileştirmesini sağlar. Koyu yeşilimsi bir renge ve güçlü fındık aromasına sahip yağ esas olarak salata sosu için kullanılır. Fenolik bileşiklerin, tokoferollerin ve sterollerin varlığı kabak çekirdeğinin bir başka faydalı özelliğidir (Parry, Cheng, Moore, & Yu, 2008). Sebzelerdeki fitokimyasalların güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Gıda matrislerindeki antioksidan aktiviteye bağlı olarak kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli patolojilerin gelişme riskinin azaldığını gösteren çalışmalar vardır(Hang vd., 2004; Wan ve ark., 2014) .

Son yıllarda, tüketici eğilimi, esas olarak bu yağların beslenme ve sağlık yararları olduğuna dair artan kanıtlar nedeniyle dünya çapında soğuk-preslenmiş yağlara doğru değişmiştir (Neđeral ve ark., 2012). Soğuk-preslenmiş yağlar herhangi bir kimyasal ve ısı uygulaması olmadan üretildiğinden, besin bileşenleri ve duyuşal özellikleri rafine yağlardan daha iyi korunur. Esansiyel yağ asitleri, fenolik maddeler ve tokoferoller gibi doğal antioksidanlar ve steroller gibi lipofilik biyoaktif bileşenler içerdiğinden beslenme ve duyuşal açıdan bir tür fonksiyonel gıda olarak atfedilirler (Akçicek & Karasu, 2018; Tekin-Çakmak, Karasu, Kayacan-Çakmakoglu, & Akman, 2021; Tekin & Karasu, 2020). "Soğuk-preslenmiş yağ" yağı herhangi bir sıcaklık uygulaması yapılmadığı anlamına gelse de, sürtünme ve yüksek çalışma basınçları nedeniyle presleme işlemi sırasında sıcaklık kendiliğinden artar (Neđeral ve ark., 2012).

Kabak çekirdeğinden yağ elde etmek için hem sıcak hem de soğuk pres işlemleri kullanılır. Bununla birlikte, geleneksel yöntemde, su ve tuzla bir hamur oluşturdudan sonra, hamur 100-130 °C'de 60 dakikaya kadar kavrulur, bu da protein fraksiyonu pıhtılaşmasına katkıda bulunur ve lipid fraksiyonunun preslenerek kolayca çıkarılmasına neden olur(Raczyk, Siger, Radziejewska-Kubzdela, Ratusz, & Rudzińska, 2017). Bu açıdan bakıldığında, balkabağı tohumlarının yağı üretmek için kavrulması ve soğuk pres işlemlerinde yüksek presleme sıcaklığının yanı sıra yağın besin kalitesini etkiler.

1.2 Tezin Amacı

Yağlarda 3-MCPD analizi uzun ve maliyetli bir analizdir. Mevcut referans yöntemlere göre Gc-MS ile yapılması gerekmektedir. Ancak Avrupa ülkelerinde regülasyonları oluşturulmuş olup, yakın zamanda ülkemizde de düzenlemeleri yapılacak olan 3-MCPD miktarı, proses analizi uygulamaları kapsamında olacaktır. Bu nedenle fabrika uygulamalarında her parti üründe analiz sonucuna ihtiyaç duyulacaktır.

Gc-MS ile bu kadar analizin, günlük olarak yapılıp, üretimi yönlendirebilmesi pratikte mümkün görünmemektedir.

Bu neden dolayı, daha hızlı ve maliyet açısından daha ekonomik yollara ihtiyaç duyulmaktadır. NIR teknolojisi şu aşamada en alternatif yöntem görünmektedir. NIR, genel prensip olarak 15-90 s aralığında analiz sonucu vermesi, herhangi bir kimyasal sarfin olmaması ve kalibrasyon işlemi yapılıp, metodun valide edilmesi sonrası kullanım noktasında uzmanlık gerektirmemesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır.

İkinci çalışma olan kabak çekirdeği yağını elde etmek için hem sıcak hem de soğuk pres işlemleri kullanılmaktadır. (Raczyk, Siger, Radziejewska-Kubzdela, Ratusz, & Rudzińska, 2017). Esansiyel yağ asitleri, fenolik maddeler ve tokoferoller gibi doğal antioksidanlar ve steroller gibi lipofilik biyoaktif bileşenler içerdiğinden beslenme ve duysal açıdan bir tür fonksiyonel gıda olarak atfedilen kabak çekirdeği yağının bu özellikleri sıcaklık farklarından dolayı etkilenebilmektedir. (Akcicek & Karasu, 2018; Tekin-Çakmak, Karasu, Kayacan-Çakmakoglu, & Akman, 2021; Tekin & Karasu, 2020) Bu nedenle farklı sıcaklık derecelerinde preslenen kabak çekirdeği yağının; fizikokimyasal özellikler, yağ asidi, sterol, fenolik bileşim, in-vitro sitotoksiklik testi ve kabak çekirdeği yağının antienflamatuvar aktivite üzerindeki etkisini belirlemek ve bu etkilerin tespitinin uzun ve maliyetli olması, proses analizi olarak kullanılmasının zor olması nedeni ile başka bir infrared temelli yöntem olan FTIR ile tespit edilmesi

amaçlanmıştır. Bu amaçla 100 °C (PSO2) ve 150 °C (PSO3) pres sıcaklığında elde edilen yağlar soğuk pres yağı (PSO1) ile karşılaştırılmıştır.

1.3 Hipotez

Gıdaları işlenmeye, proses edilmeye başladığından itibaren 3-MCPD gıda ürünlerinde mevcuttu (Razak vd., 2012). Fakat son zamanlarda bitkisel proteinlere ilaveten bitkisel yağlar ve bebek mamaları ile süt, tahıl ürünleri, et, kahve, malt ürünleri, bisküvi, kızarmış peynir, tütülenmiş ürünler gibi farklı ısıl işlem görmüş gıdalarda da fazla miktarlarda belirlenmesi ile ve kanserojen özelliklerinden dolayı bu bileşenlerin incelenmesi ve tespit edilmesi gerekliliği ihtiyacı daha fazla artmıştır (Dolezal & Velisek, 1992).

Son ürünleri kullanan insanların karşı karşıya kaldıkları şartları tespit etmek gayesi ile, gıda ürünlerindeki 3-MCPD, 2-MCPD ve glisidolün seviyelerini hassas bir şekilde belirleyen, analitik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Birçok yöntem, asit ve alkali içerisinde transesterifikasyon aracılığı ile 3-MCPD'lerin esterlerden ayrıştırılmasını içermektedir (Dolezal & Velisek, 1992). Son zamanlarda kütle spektrometrik metodu ile tespit hassasiyeti yükseltilmiştir. Doğrulanmış GC/MS yöntemi, gıda ürünleri ve gıda katkı maddelerindeki 3-MCPD'yi 0.010 mg/kg'e kadar düşük konsantrasyonlarda belirleme kapasitelerine sahiptirler ve AOAC (metod no 2000.01) tarafından ilk tespit yöntemi olarak kabul onaylanmıştır (Arisseto vd., 2017).

Ancak Gc-Ms analiz protokolü uzun ve hassasiyeti yüksek bir analizdir. Aynı zamanda maliyetli bir analiz olması önemli bir dezavantajdır. Buna ek olarak uzmanlık gerektiren bir alt yapıya ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak Avrupa ülkelerinde regülasyonları oluşturulmuş olup, yakın zamanda ülkemizde de düzenlemeleri yapılacak olan 3- mcpd miktarı, proses analizi uygulamaları kapsamında olacaktır. Bu nedenle fabrika uygulamalarında her parti üründe analiz sonucuna ihtiyaç duyulacaktır.

Gc-Ms ile bu kadar analizin, günlük olarak yapılp, üretimi yönlendirebilmesi pratikte mümkün görünmemektedir.

NIR spektroskopisi elektromanyetik spektrumun 780 ile 2500 nm dalga boyu aralığındaki bölgesini içermekte ve yapı içerisindeki O-H, C-H, C-O ve N-H gibi moleküler bağların titreşimleri ile ilgili olarak absorpsiyon bantları oluşumuna neden olmaktadır. İlgili olan kısımda analiz edilecek olan numune yakın kızılötesi ışınları ile temas ettiği anda, bu bağlar titreşimsel enerji değişiklikleri ile karşı karşıya gelmekte ve bu unsurların sonucu olarak da moleküller titreştiği zaman NIR bölgesindeki organik moleküllerin enerji

absorpsiyonu ortaya çıkmaktadır (Ertugay vd., 2011). NIR teknolojisi şu aşamada en alternatif yöntem görünmektedir. NIR, genel prensip olarak 15-90 s aralığında analiz sonucu vermesi, herhangi bir kimyasal sarfin olmaması ve kalibrasyon işlemi yapıp, metodun valide edilmesi sonrası kullanım noktasında uzmanlık gerektirmemesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (Blanco & Villarroya, 2002; Cen & He, 2007; Çağlar vd., 2019; Ertugay & Baslar, 2011; Newgard, 2004; Osborne vd., 1993;).

İkinci çalışmada fenolik maddeler tokoferoller ve esansiyel yağ asitleri gibi doğal antioksidanlar ve steroller gibi lipofilik biyoaktif bileşenler içerdiğinden beslenme ve duyuşal açıdan bir tür fonksiyonel gıda olarak atfedilen kabak çekirdeği yağının bu özellikleri sıcaklık farklarından dolayı etkilenebilmektedir. (Akcicek & Karasu, 2018; Tekin-Çakmak, Karasu, Kayacan-Çakmakoglu, & Akman, 2021; Tekin & Karasu, 2020) Bazı çalışmalar, kavurma işlemlerinin kabak çekirdeği yağının biyoaktif bileşiklerinin değişmesi üzerindeki etkisi hakkında raporlar sunmaktadır. Murkoviç, Piironen, Lampi, Kraushofer ve Sontag (2004) kabak çekirdeğine 150°C sıcaklık uyguladılar ve yağ asitleri ve tokoferoller, fitosterollerin zamana bağlı olarak değişimlerini değerlendirdiler. Nederal ve ark. (2012) 110 °C'de 45 dakika boyunca kavrulmuş kabak çekirdeği macunu su ve tohum ile hazırladılar ve iki farklı soğuk-pres işlemi görmüş yağ ile karşılaştırdı. Ayrıca presleme sıcaklığının yağların özellikleri üzerindeki etkisini de değerlendirdiler. Başka bir araştırmada, tohumlar 110 °C'de 40 dakika kavrulmasına rağmen, soğuk-preslenmiş bir yöntem kullanarak, yağların fizikokimyasal özelliklerini nasıl etkilediğini araştırmışlardır (Raczyk ve ark., 2017). Vujasinoviç, Djilas, Dimic, Basic ve Radocaj (2012) da tohum, tuz ve sudan bir macun hazırdı ve macunu 90°C, 110°C ve 130°C'de 30 ve 60 dakika kavurdu ve yağların biyokimyasal bileşimindeki değişiklikleri değerlendirmiştir.

Bu çalışmada 100 °C(PSO2) ve 150 °C (PSO3) pres sıcaklığında elde edilen yağlar soğuk pres yağı (PSO1) ile karşılaştırılmıştır. Fenolik bileşikler ve steroller gibi kabak çekirdeğindeki biyoaktif maddelerin antioksidan özelliklerinin bilindiği göz önüne alındığında, in-vitro sitotoksiklik testini araştırmak önemlidir. Ancak bu analizlerin proses analizi kapsamında üretimi yönlendirmesi uzun ve maliyetli bir süreçtir. Bu sıcaklık değişimlerinden kaynaklanan farklılıkları tespit etmek için infrared temelli yöntem olan FTIR ile bu biyoaktif maddelerin tespit edilmesi bu çalışmada amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma literatüre birçok yenilik katmaktadır.

2.1 Materyal

Kalibrasyon oluşturma bilmek için değişik 3-MCPD yüküne sahip palm yağları seçilmiştir. Palm yağları özellikle deodarizasyon sırasında yüksek sıcaklıklara maruz kaldığı için ve yapısal özelliklerinden dolayı 3-MCPD oluşumu açısından daha hassas olduğu için seçilmiştir. Yüksek yüklü 3-MCPD li yağlar için ham yağlar, orta dereceli yüklü olanlar için topraklama öncesi yağlar ve düşük yüklü yağlar içinde topraklama sonrası yağlar kullanılmıştır. Yağlar Malezya'dan gelmiştir. Tüm çalışmalar boyunca sıcaklık dalgalarından etkilenmemeleri için +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Aynı zamanda NIR cihazının validasyonu sırasında sızma zeytinyağı kullanılmıştır. Zeytinyağı düşük sıcaklıklarda işlem gördüğü için 3-MCPD bulunmamaktadır. Dışarıdan kontrollü şekilde 3-MCPD ilave ederek validasyon için en uygun yağ olması nedeniyle zeytinyağ seçilmiştir. Zeytinyağ da tüm çalışma boyunca +4 °C de muhafaza edilmiştir.

İkinci çalışmanın materyali olan kabak çekirdeği yağ örnekleri soğuk pres ekstraksiyon yöntemi ile üretildi. Yağların üretimi için soğuk pres makinesi (Tokul Ltd, Co., İzmir, Türkiye) kullanılmıştır. Soğuk pres makinesi saatte 10 kg çekirdek işleme kapasitesine sahipti ve dolum haznesi boyutları 5 mm'ydı. Soğuk pres işlemi sırasında pres sıcaklığı 50 °C'yi geçmedi. Daha sonra, soğuk pres koşullarına ek olarak, kabak çekirdeği yağının sıcak pres ekstraksiyonu için iki pres sıcaklığı (100 °C ve 150 °C) uygulanmıştır. Preslendikten sonra, katı parçacıkları yağlardan çıkarmak için filtrasyon uygulandı. Son olarak kabak çekirdeği yağları renkli şişelerle paketlenerek analizleri için 4°C'de bekletildi. Analizde kullanılan kimyasalların tamamı Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma'dan (St. Louis, ABD) analitik saflık ve üzeri (HPLC saflığı ve GC saflığı) elde edilmiştir.

2.2 Analiz Yöntemi

2.2.1 Gc-Ms Metodu

Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışları (DGF Standart C-VI 18 metodu (10))

Çalışma Çözeltileri

d5-3-MCPD-1,2-bis-palmitol ester Stok Çözeltisi (100 ppm): d5-3-MCPD-1,2-bis-palmitol ester (örneğin 26,87 ug/ml toluende; eşdeğer olarak 5,0 ug/ml serbest 3-MCPD içerir.) 1 mg standardın tamamı 10 ml balon içerisinde tolüen ile çözülerek hazırlanır.

d5-3-MCPD-1,2-bis-palmitol ester Çalışma Çözeltisi (3-MCPD eşdeğeri 0,9304 ppm): Stok çözeltisinden 1.25 ml alınarak tolüen ile 25 ml balon joje içerisinde hazırlanır.

3-MCPD-1,2-bis-palmitol ester (26,6 ug/ml tolüende; eşdeğer olarak 5,0 ug/ml serbest 3-MCPD)

Glycidyl Stearate Stok Çözelti (1000 ppm) : 1000 ppm olarak tolüen ile hazırlanır.

Glycidyl Stearate Çalışma Çözeltisi (25 ppm) : Stok çözeltiden tolüen ile seyreltilerek 25 ppm olacak şekilde hazırlanır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (25 ml) : Konsantrasyonu 20 g/L olacak şekilde metanol ile hazırlanır. 0,5 g NaOH tartılır ve metanol ile 25 ml ye tamamlanır.

% 25 lik Sülfürik Asit (H₂SO₄) Çözeltisi (100ml) : %95 lik H₂SO₄ çözeltisinden 16,9 ml alınır ve saf su ile 100 ml ye tamamlanır.

Asitlendirilmiş Sodyum Klorür Çözeltisi (200 g/l) : 200 g sodyum klorür tartılır ve üzerine 35 ml %25 lik sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek su ile 1 L ye tamamlanır. Hazırlanmış olan solüsyonun 600 ul si 200 ul hazırlanmış olan sodyum hidroksit çözeltisini nötralize etmelidir. Nötralize işlemi fenol fitaleyn ile kontrol edilir (Fenol fitaleyn çözeltiyi berraklaştırmalı).

Asitlendirilmiş Sodyum Klorürsüz Çözeltisi (600 g/l): 600 g sodyum bromür tartılır ve üzerine 35 ml %25 lik sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek su ile 1 L ye tamamlanır. Hazırlanmış olan solüsyonun 600 ul si 200 ul hazırlanmış olan sodyum hidroksit çözeltisini nötralize etmelidir. Nötralize işlemi fenol fitaleyn ile kontrol edilir (Fenol fitaleyn çözeltiyi berraklaştırmalı).

Doymuş Fenil Boronik Asit Çözeltisi/PBA (Türevlendirme Çözeltisi): 2.5 g PBA üzerine 19 ml aseton ve 1 ml su ilave edilerek hazırlanır.

t-BME-solvent karışımı (8:2): 8 ml tert-butilmetileter (t-BME) ile 2 ml etil asetat karıştırılarak hazırlanır.

Dietil eter/etil asetat karışımı (6:4): 60 ml dietil eter ile 40 ml etil asetat karıştırılarak hazırlanır.

Yöntem:

Gc-Ms ile 3-MCPD Analiz Yöntemi

Bu kapsamda 25 tane ham yağ, 25 tane topraklama öncesi yağ ve 25 tane topraklama sonrası yağ ,numunesi Gc-Ms ile analiz edilecektir.

Deney A – Bu deneyin prensibi 3-MCPD ve glisidol içermeyen numune içerisine bu maddelerin yerine geçen standardın numuneye eklenmesi ile tert-butil metil eterinde çözündürülmesidir. Bu çözelti sodyum hidroksitin metanollü çözeltisi ile seyreltilir. Bu reaksiyon belirli oranda sodyum kloridin asidik çözeltisi ilavesi ile sonlandırılır. Bu asidik koşullar altında serbest glisidol inorganik klorid ile reaksiyonu ile 3-MCPD ve daha düşük oranlarda 2-MCPD ye dönüşür. Numunedeki istenmeyen non-polar bileşikler sulu fazın n-hekzan ile ekstraksiyonu ile uzaklaştırılır. Yerine geçen standart ile analit birlikte sulu fazın dietileter, etil asetat veya bunların birlikte kullanımı ile ekstrakte edilerek organik faza geçirilir. Türevlendirme PBA (fenil boranik asit) nın organik fazla reaksiyonu ile gerçekleşir. PBA nın uzaklaştırılması için ekstrakte edilen analitler organik çözücüye transfer edilir. Elde edilen ekstrakt susuz sodyum sülfat geçirilerek azot altında kurutulur ve izooktanla çözülür ve GC ye enjekte edilir.

Deney B – Bu deneyin prensibi 3-MCPD ve glisidol içermeyen numune içerisine bu maddelerin yerine geçen standardın numuneye eklenmesi ile tert-butil metil eterinde çözündürülmesidir. Bu çözelti sodyum hidroksitin metanollü çözeltisi ile seyreltilir. Bu reaksiyon asidik klor içermeyen tuz solüsyonu eklenerek sonlandırılır (sodyum bromid). Kloridsiz asidik şartlar altında serbest glisidol tuz kullanımına göre farklı bir reaksiyon verir. Diğer hazırlık aşamaları Deney A da ki gibidir.

GC-MS Şartları

Enjeksiyon miktarı: 1.2 ul

Taşıyıcı gaz: Helyum 1ml /dk

Enjeksiyon splitless, purge akışı 50ml/dk (0,5 dakikadan 1 dakikaya kadar), septum purge 3 ml/dakika

Tablo 2.1 GC Fırın sıcaklık programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
0	85 °C	0,5 dakika
6 °C/dakika	150 °C	
12 °C/dakika	180 °C	
25 °C/dakika	280 °C	7 dakika

Enjeksiyon başına analiz süresi yaklaşık 25 dakikadır.

MS dedektör şartları:

EI/SIM modu

3-MCPD için iyonlar: 149/150/201/203

3-MCPD için iyonlar: 146/147/196/198

Miktar analizi için iyonlar

3-MCPD (147) ve 3-MCPD-d5 (150)

Analizin Yapılması

- Analizi yapılacak yağdan iki ayrı deney tüpüne A ve B reaksiyonu için 0,1 g tartılır.
- Her deney tüpüne 100 ul standart (3-MCPD-d5) ve 1 ml tBME karışım çözeltisi eklenerek vortex ile karıştırılır.
- Her numuneye 200 ul sodyum hidroksit çözeltisi eklenir ve çalkalanıp 2dk beklenir.
- A numunesine 2 dk sonunda asitlendirilmiş 600 ul NaCl eklenerek reaksiyon sonlandırılır.
- B numunesine 2 dk sonunda asitlendirilmiş 800 ul NaBr eklenerek reaksiyon sonlandırılır.

Not: Verilen reaksiyon zamanına uymak önemlidir.

- Reaksiyon sonlandırma çözeltileri ilave edildikten sonra her iki deney tüpüne 600 ul n-hekzan eklenerek çalkalanır faz ayrımı olunca üstteki faz pastör pipeti ile atılır.
- Tekrar 600 ul n-hekzan ilave edilerek çalkalanır ve üstteki organik hekzan fazı atılır.
- Elde edilen sulu faza 300 ul türevlendirme çözeltisi PBA ilave edilir ve 1dk vortex ile karıştırılır.

- Deney tüplerinin kapakları kapatılarak 90 °C su banyosunda 30 dakika bekletilir.
- Deney tüpleri oda sıcaklığına getirilene kadar soğutulur.
- Yeni deney tüplerine 2-3 spatül susuz sodyum sülfat ilave edilir.
- Oda sıcaklığına getirilen deney tüplerine 600 ul dietil eter + etil asetat karışımı (600ul/ml dietileter; 400ul/ml etil asetat) ilave edilir ve üstteki organik faz alınarak sodyum sülfat konulan deney tüplerine alınır. Bu işlem 2 defa uygulanır.
- Elde edilen ekstraktlar tamamen kuruyana kadar azot uçurma düzeneğinde uçurulur.
- Deney tüplerine 500 ul izooktan ilave edilir.
- Berrak olan çözeltiden şırınga ile 1 ul alınarak GC'ye enjekte edilir.

Deney A ve B den gelen çözeltiler ayrı tüplerde analize alınır.

Deney A dan gelen 3-MCPD ve glisidol toplamını verir.

Deney B den gelen ise sadece 3-MCPD sonucunu verir.

HESAPLAMALAR

$$W_{3-MCPD(A)} = SF_A \times W_{D5-3-MCPD(A)} / SF_{iA}$$

$$W_{3-MCPD(A)} = \text{Deney A 3-MCPD miktarı mg/kg}$$

$$SF_A = \text{Deney A 3-MCPD alanı}$$

$$W_{D5-3-MCPD(A)} = \text{3-MCPD-d5 konsantrasyonu mg/kg}$$

$$SF_{iA} = \text{Deney A 3-MCPD-d5 alanı}$$

(2.1)

$$W_{3-MCPD(B)} = SF_B \times W_{d5-3-MCPD(B)} / SF_{iB}$$

$$W_{3-MCPD(B)} = \text{Deney B 3-MCPD miktarı mg/kg}$$

$$SF_B = \text{Deney B 3-MCPD alanı}$$

$$W_{D5-3-MCPD(B)} = \text{3-MCPD-d5 konsantrasyonu mg/kg}$$

$$SF_{iB} = \text{Deney B 3-MCPD-d5 alanı}$$

2.2.2 NIR Yöntemi

Genel olarak spektroskopik yöntem prosedürleri, çözeltilerin ışığı absorbe etmesi, geçirmesi veya yansıtması gibi niteliklerin belirlenmesi prensibine dayanan enstrümantal analizlerdir. Bir maddenin belli bir dalga boyundaki bir ışığı absorbe etmesi, onun öteki kimyasal veya fiziksel unsurları gibi belirtici bir niteliktir. NIR spektroskopisi elektromanyetik spektrumun 780 ile 2500 nm dalga boyu aralığındaki bölgesini içermekte ve yapı içerisindeki O-H, C-H, C-O ve N-H gibi moleküler bağların titreşimleri ile ilgili olarak absorpsiyon bantları oluşumuna neden olmaktadır. İlgili olan kısımda analiz edilecek olan numune yakın kızılötesi ışınları ile temas ettiği anda, bu bağlar titreşimsel enerji değişiklikleri ile karşı karşıya gelmekte ve bu unsurların sonucu olarak da moleküller titreştiği zaman NIR bölgesindeki organik moleküllerin enerji absorpsiyonu ortaya çıkmaktadır (Blanco & Villarroya, 2002; Cen & He, 2007; Çağlar vd., 2019; Ertugay & Baslar, 2011; Newgard, 2004; Osborne vd., 1993;).

NIR kalibrasyonu için Buchi N500 marka NIR cihazı kullanıldı. 75 adet yağ numunesinde 3-MCPD analizi yapıldıktan sonra, aynı numuneler 55 °C de eritilerek, NIR cihazında okutulup, tanıtıldı. Bu doğrultuda da kalibrasyonlar oluşturuldu. Daha sonra 75 adet yağ numunesi tekrar NIR cihazı ile okutularak, Gc-Ms sonucu ile karşılaştırıldı. Ayrıca daha önce NIR cihazında okutulmamış, 25 adet numune NIR cihazında analiz edilip, daha sonra Gc-Ms ile analiz edildi ve birbirleri ile karşılaştırılmaları yapıldı.

2.2.3 NIR İstatistiksel Analiz

Laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen veriler bilgisayara aktarılacak ve ortalamalar ve standart sapmalar hesaplanacaktır. Ardından sonuçlar tablo ya da grafik olarak sonuç raporuna aktarılacaktır.

Proje süresince yapılacak çalışmalar 3 tekerrürlü olarak yürütülecektir. Yapılan tüm çalışmalar ve elde edilen sonuçlar, her bir yağ numunesi için ayrı ayrı toplanacak ve istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulacaktır. Verilerin değerlendirilmesinde varyans analizi uygulanacaktır. Varyans analizleri, Windows tabanlı SAS (SAS 8.2, North Carolina, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilecektir. Ortalamalar arasındaki önem dereceleri ise Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında belirlenecektir.

2.2.4 Kabak Çekirdeği ve Kabak Çekirdeği Yağının Fizikokimyasal Analizi

Kabak çekirdeğinin kuru madde, protein ve yağ içeriği analizi resmi prosedürlerle açıklanan yöntemle göre yapıldı. Kurutma fırınında 2,5 saat boyunca 105 °C'de kurutularak gerçekleştirilen kuru madde içeriği analizi (FN 120, Nuve, Ankara, Türkiye). Toplam protein içeriği Dumas yöntemi ile otomatik azot analizörü (FP 528, Leco, ABD) kullanılarak belirlendi. Elde edilen azot değerlerinin 6,25 ile çarparak toplam protein içeriği belirlendi. Soxhlet ekstraksiyon sistemi tarafından belirlenen yağ içeriği ve hekzan çözücü olarak kullanılmıştır (Karasu vd., 2015). Numunelerin serbest yağ asitliği (FFA) ve peroksit değerleri (PV), sırasıyla IUPAC 2.201 ve 2.501 tarafından açıklanan yöntemle göre belirlendi (IUPAC, 1992). Kabak çekirdeği yağının toplam tokoferol içeriği (kg yağ başına α -tokoferol mg) AOAC'nin HPLC yöntemi ile belirlendi (2000). Kromatografik ayırma, etil asetat:asetik asit: 1,5 ml/dk akışta hekzane (1:1:98 v/v/v) oluşan mobil faz kullanılarak gerçekleştirildi. Algılama, floresan dedektörü tarafından 290 nm (eksitasyon) ve 330 nm (emisyon) dalga boylarında gerçekleştirildi. Numunelerdeki tokoferol sayısı, α -tokoferol standardı ile elde edilip harici kalibrasyon eğrileri (0-10 g ml $r^2 \mu >0,99$) kullanılarak ml yağ özünde g tokoferoller olarak ifade edilmiştir.

2.2.5 Sterol Kompozisyon Tayini

Ön işleminden sonra sterol bileşimi yapılmadan önce; sterol bileşimi, 0,5 g yağ numunesi bir test tüpüne aktarıldı ve bir saat boyunca 80 °C'de 5 ml doymuş metanolik KOH ile sabunlaştırılmıştır. Daha sonra, üç kez 5 ml hekzan kullanılarak çıkarıldı; elde edilen çözelti susuz sodyum sülfat ile kurutuldu. 0,5 ml kurutulmuş hekzan 0,1 ml bis (trimetilsilyl) trifluoroacetamide/trimethylchlorosilane (4:1 v/v) çözeltisi ile muamele edildi. Ön işleminden sonra, FID ile donatılmış GC kullanılarak belirlenen yağ örneklerinin sterol bileşimi, sterollerin ayrılması için CP-SIL 24 CB (60m 0.32 mm 1.00 μ m) kullanılarak yapıldı.

Sterol bileşim analizi için aşağıdaki yöntem parametreleri belirlendi. Çalışma koşulları şu şekildeydi: taşıyıcı gaz, helyum; akış hızı 0,8 ml/dak; enjektör sıcaklığı, 280°C; dedektör sıcaklığı, 300°C; fırın sıcaklığı programı, başlangıç sıcaklığı 2 dakika için 50 °C idi, 60 °C/dk'da 245°C'ye yükseltildi, 1 dakika bekletildi ve daha sonra 3°C/dk' da 275°C'ye yükseltildi, 35 dakika boyunca bu şartlarda tutulmuştur (Kamm ve ark., 2002).

2.2.6 Yağ Asidi Bileşim Tayini

Kabak çekirdeği ve kabak çekirdeği yağı örnekleri, AOAC (1990) tarafından açıklanan yöntemle göre BF3-metanol kullanılarak metillendirilmiştir. Yağ asidi metil ester gaz kromatografisine (kılcal sütun, HP-88, 100m0.25mm, film kalınlığı: 0.20 mm) aktarılmış ve alev iyonlaştırma dedektörü (FID) ile donatılmış gaz kromatografisi (Agilent 6890N) ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz, 0,5 ml/dk debi ile helyum olarak seçildi. Enjektör ve dedektörün sıcaklıkları sırasıyla 250°C ve 280°C olarak ayarlandı. 120°C'lik ilk fırın sıcaklığı 10 dakikaydı, 5°C/dk hızında 240°C'ye yükseltildi. Enjeksiyon hacmi 1 µL idi. Kabak ve kabak çekirdeği yağ örneklerinin yağ asidi metil esterleri, numunelerin tutma süresi ve uygun yağ asitleri metil ester standartları karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Bireysel yağ asidi içeriği, doymuş yağ asidi (SFA), tekli doymamış yağ asidi (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriğinin yüzdesi sunulmuştur.

2.2.7 Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesinin Ekstraksiyonu

Metanol, fenolik bileşiklerin kabak çekirdeği ve kabak çekirdeği yağından çıkarılması için kullanılmıştır. İlk olarak, 2 ml hekzana 4 ml yağ ile karıştırıldı ve hekzan / yağ karışımına 4 ml metanol eklendi. Daha sonra, elde edilen çözelti fenolik bileşiklerin çıkarılması için çalkalanan su banyosunda (Memmert WB-22) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra, özler 10 dakika boyunca 2.500 g'da santrifüjlendi (Hettich, Universal 320R, Tuttlingen, Almanya) ve metanolik faz alındı. Bu işlem hekzan fazını çıkarmak için üç kez tekrarlanmıştır.

2.2.8 Toplam Fenolik İçerik (TPC) Tayini

Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi (Singleton & Rossi, 1965) kabak çekirdeği yağlarının TPC'sini belirlemek için kullanıldı. İlk olarak, 0.2 N Folin-Ciocalteu reaktifinin 2.5 ml'si ve %7.5 Na₂CO₃ 'ün 2 ml'si metanolik ekstraktın 0.5 ml'si ile karıştırıldı. Bu karışım karanlık bir yerde oda sıcaklığında 45 dakika tutuldu.

Bekletme süresinin sonunda, emici 760 nm'de bir UV-VİS Spektrofotometresi (Shimadzu, UV-1800) kullanılarak kaydedildi. TPC gallik asit eşdeğeri olarak belirlendi.

TPC, gallik asit ile elde edilen bir kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Toplam fenolik Gallik asit eşdeğerleri (mg GAE/g özü) olarak ifade edildi.

2.2.9 DPPH (2,2--difenil-1-picrylhydrazyl) Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini

Metanolik özlerin antioksidan kapasite (AC) değerleri Singh, Murthy ve Jayaprakasha (2002) tarafından açıklanan yöntemle göre DPPH (1,1-difenil-2- picrylhydrazyl) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra 0.1 ml ekstresi ve 2 ml metanolik DPPH çözeltisi karıştırıldı. Karışım kuvvetli bir şekilde çalkalandı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Absorbans bir spektrofotometre (UV-Mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japonya) tarafından 517 nm olarak okunarak, kaydedildi. Trolox eşdeğerinin antioksidan kapasite (TEAC) değeri, gram soğuk pres kabak çekirdeği yağı numunesi (mmol TE/g özü) başına mili mole Trolox eşdeğerleri olarak ifade edilmektedir.

2.2.10 Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi

Metanolik özlerin bireysel fenolik bileşikleri, HPLC tarafından bir diyot dizisine (HPLC-DAD, Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) bağlı olarak belirlendi. Metanolik ekstrakt 0.45-µm membran filtresinden süzülde ve filtrelendi numunenin 1 ml'si HPLC sistemine (LC-20AD pompa, SPD20A DAD dedektörü, SIL-20A HT otosampler, CTO-10ASVP kolon fırını, DGU-20A5R gaz giderici ve CMB-20A iletişim veri yolu modülü; (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya). Ayırmalar 40°C'de 250 mm 4,6 mm uzunluğunda, 5 µm parçacık boyutuna sahip ters fazlı bir sütunda (Intersil® ODS C-18, GL Sciences, Tokyo, Japonya) gerçekleştirildi. Mobil fazlar solvent A (%0,1(v/v)asetik asit ile damıtılmış su) ve solvent B (%0,1(v/v)asetik asit ile asetonitril) kullanıldı. Gradyan elüsyonu % 10 B (0 -2 dk), % 10 ile % 30 B (2 -27 dk), % 30 ila % 90 B (27 -50 dk) ve % 90 ila % 100 B (51-60 dk) ve 63 dakikada başlangıç koşullarına geri döndü. Akış hızı 1 ml/dk idi. Kromatogramlar 254-356 nm'de çekildi. Tanımlama ve nicel analiz, saklama sürelerine ve standart eğrilere göre yapıldı. Fenolik miktarların sonucu numuneler için mg/kg olarak ifade edildi.

2.2.11 In-Vitro Sitotoksiklik Analizi

PSO 1 (soğuk presleme), PSO2 (100°C) ve PSO3 (150°C)in vitro sitotoksikliği, Çakır Koç ve ark. (2018) tarafından açıklandığı gibi XTT tahlilleri kullanılarak bazı değişikliklerle gerçekleştirildi.

Caco-2 adenokarsinom hücre hattı örneklerin sitotoksik etkileri için kullanılmıştır. Kısacası, hücre hattı% 5 CO₂ inkübatörde 3-4 gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, hücreler bir trypsinization işlemi ile çıkarıldı ve bir Thoma hücre sayım odası ile sayıldı. Daha sonra, 96 kuyu düz tabanlı mikro plakalarda 104 hücre /

kuyu kaplandı ve kuyunun dibine yapışması için 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Kuluçka işleminden sonra, örneklerin farklı konsantrasyonları (30 mg/ml, 25 mg/ml, 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml ve 1 mg/ml) her kuyuya eklendi ve 24 saat boyunca tekrar inkübe edildi. Kuyudaki ortam kısmı çıkarıldı ve kuyuya 0,5 mg/ml'de 100 µl XTT çözeltisi konuldu. Mikro plakaların 3 saat boyunca 37 °C'de inkübasyonunu takiben, optik yoğunluk (OD) bir mikro plaka okuyucu (Elisa okuyucu Elx800, Biotek, Vermont, ABD) kullanılarak 450 nm olarak ölçüldü ve uygulanabilir hücre sayısı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{OD Sample} / \text{OD Control} * 100 \quad (2.2)$$

2.2.12 Antienflamatuvar Aktivite

PSO örneklerinin antienflamatuvar aktivitesini belirlemek için Sakat ve ark. (2010) tarafından tanımlanan bir protein denatürasyon tahlili yapıldı. Kısaca PBS'de 25 µl kabak çekirdeği yağı ve %1 sığır serum albümin çözeltisi içeren bir reaksiyon karışımı hazırlandı ve pH 6.8 olarak ayarlandı. Reaksiyon karışımları 15 dakika boyunca 37 °C'de bir su banyosunda ısıtıldı, daha sonra 5 dakika boyunca 75 °C'de inkübe edildi. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, numunelerin absorpsansı 660 nm'de bir spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japonya) kullanılarak ölçüldü. Test üç taraflı olarak yapıldı ve BSA protein denatürasyonunun yüzde inhibisyonu denkleme göre hesaplandı.

$$\text{Yüzde inhibisyon yüzdesi} = (A_C - A_S) / A_C \times 100 \quad (2.3)$$

Burada AC kontrolün emiciliğidir ve A_S test örneğinin emiciliğidir.

2.2.12 FTIR Spektrometrik Analiz

Bu çalışmada elmas kristal modüllü ATR aksesuarı ile donatılmış Bruker Tensor 27 spektrometresi (Bremen-Almanya) kullanılmıştır. Dedektör, KBR ışın ayırıcılı bir DLATGS dedektörü kullanıldı. Cihaz kontrolü ve veri toplama için Bruker GmbH'den Windows için OPUS programı Sürüm 7.2 kullanıldı. Kızılötesi spektrumlar, 4 cm⁻¹ çözünürlükte 3800 ila 600 cm⁻¹ arasında değişen dalga boyunda kaydedildi ve spektrum başına 16 tarama toplandı.

Yağ numunesinin bir damlası ATR kristali üzerine damlatıldı. Her numunenin beş kopyası aynı koşullarda ölçüldü ve her numune için bir ortalama spektrum elde edildi. Her ölçümden sonra kristal elmasın yüzeyi aseton ve distile su ile temizlendi. Temiz ve

kuru elmas kristal yüzeyinin havaya karşı spektrumları kaydedildi ve her ölçüm için arka plan olarak kullanıldı.

2.2.13 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz sonuçları, standart sapmaları ile üç taraflılıkların ortalama değerleri olarak bildirilmiştir. Dört farklı kurutma yönteminden elde edilen kabak çekirdeği yağı örneklerinin karşılaştırılmasında tukey testi kullanılmıştır. JMP ver. 9 yazılımının (SAS Enstitüsü) 0,05 önem düzeyinde kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlenen numunelerdeki farklılıkların istatistiksel önemi hesaplandı.

3.1 Gc-Ms ile 3-MCPD Analizleri ve NIR Kalibrasyonu

İlk basamak olarak, NIR kalibrasyonunu oluşturabilmek için değişik 3-MCPD yüküne sahip palm yağları seçildi. 75 adet palm yağı numunesi Gc-Ms ile analizlenerek 3-MCPD miktarları belirlendi. Bu doğrultuda sonuçlar NIR cihazına yüklenerek kalibrasyon eğrisi tamamlandı. Bu süreçte Gc-Ms ile analiz sonucu belirlenen numuneler, tekrar NIR ile de analizlenerek, farklılıklar izlendi. Sonuçlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması

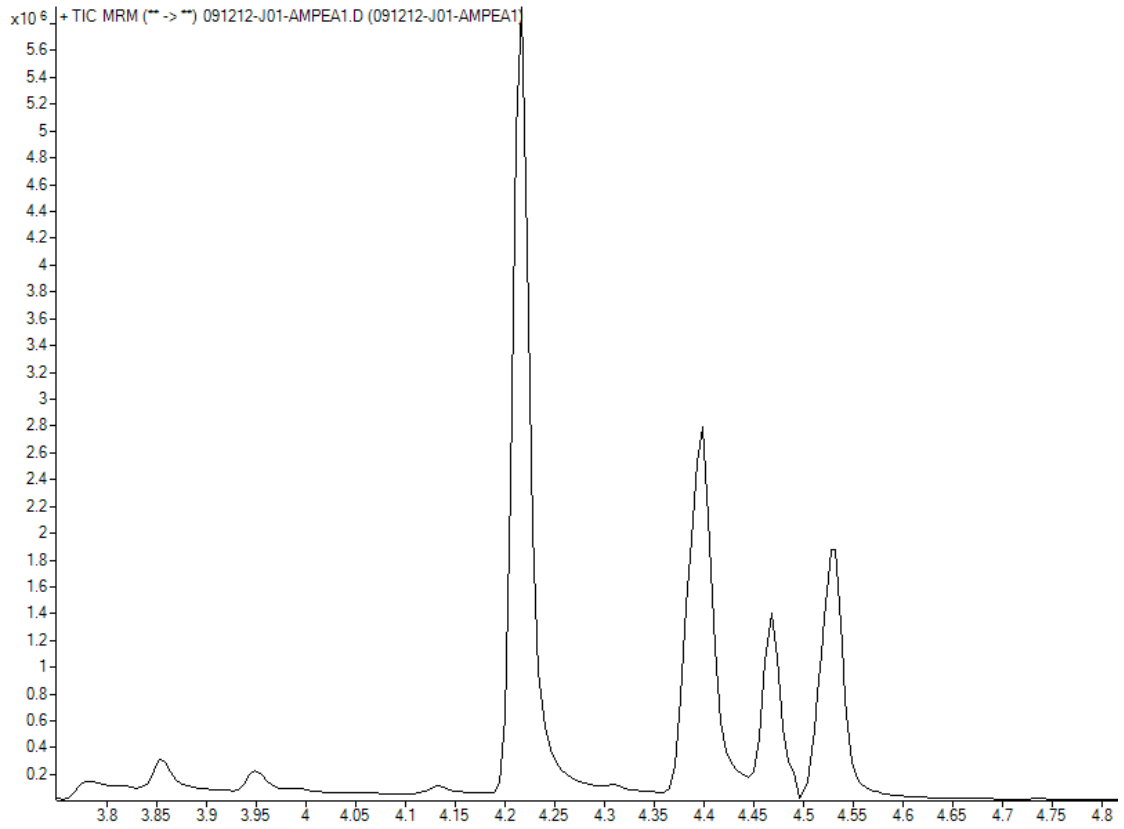
No	Gc-Ms(ppm)	NIR(ppm)
1	0,09	0,12
2	0,12	0,15
3	0,22	0,29
4	0,23	0,27
5	0,25	0,19
6	0,26	0,26
7	0,27	0,31
8	0,28	0,26
9	0,29	0,33
10	0,31	0,38
11	0,33	0,39
12	0,34	0,39
13	0,34	0,38
14	0,35	0,32
15	0,36	0,41
16	0,35	0,39
17	0,37	0,42
18	0,37	0,42
19	0,38	0,41
20	0,38	0,46
21	0,39	0,37
22	0,4	0,49
23	0,45	0,51
24	0,47	0,43

Tablo 3.1 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması (devamı)

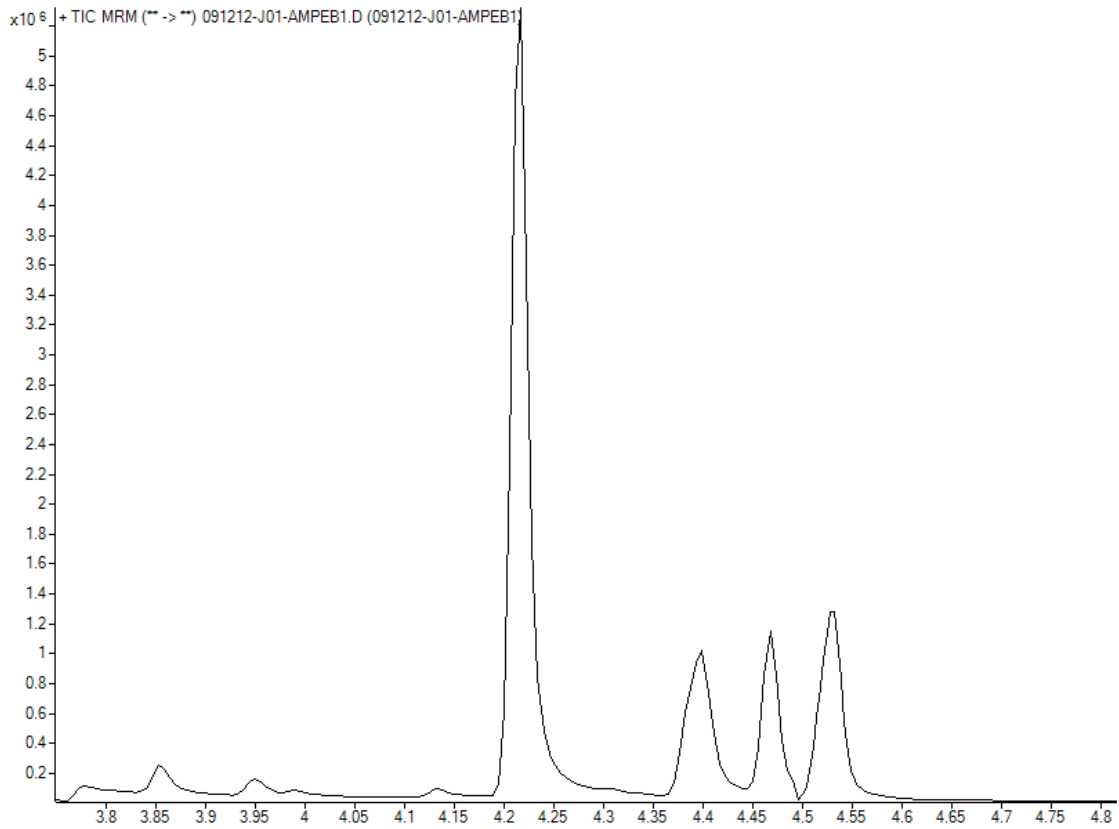
25	0,48	0,54
26	0,49	0,56
27	0,51	0,58
28	0,52	0,49
29	0,55	0,57
30	0,61	0,66
31	0,63	0,63
32	0,66	0,71
33	0,71	0,63
34	0,94	1,01
35	0,98	0,93
36	1,13	1,19
37	1,23	1,27
38	1,27	1,22
39	1,37	1,31
40	1,78	1,87
41	1,78	1,85
42	1,97	1,92
43	2,13	2,17
44	2,16	2,21
45	2,2	2,29
46	2,36	2,41
47	2,39	2,46
48	2,46	2,51
49	2,48	2,41
50	2,49	2,41
51	2,58	2,58
52	2,6	2,66
53	2,62	2,55
54	2,63	2,52
55	2,63	2,58
56	2,64	2,71
57	2,64	2,73
58	2,65	2,69
59	2,66	2,59
60	2,67	2,71
61	2,69	2,74

Tablo 3.1 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması (devamı)

62	2,7	2,61
63	2,71	2,64
64	2,72	2,63
65	2,76	2,81
66	2,76	2,87
67	2,81	2,88
68	2,83	2,87
69	2,87	2,91
70	2,92	3,01
71	2,95	2,97
72	3,08	3,21
73	3,11	3,19
74	3,2	3,22
75	3,21	3,29



Şekil 3.1 Gc-Ms çıktısı örneği 1



Şekil 3.2 Gc-Ms çıktısı örneği 2

NIR kalibrasyonu sonrası 25 adet farklı 3-MCPD yüküne sahip, kalibrasyon sırasında kullanılmamış palm yağ numuneleri; kalibrasyonun etkinliğini göstermesi açısından NIR cihazında ayrıca analizlenmiştir. Tablo 3.2 ‘de görüldüğü gibi sonuçlar alınmıştır.

Tablo 3.2 Gc-Ms ve NIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması

No	Gc-Ms(ppm)	NIR(ppm)	No	Gc-Ms(ppm)	NIR(ppm)
1	0,14	0,16	14	0,78	0,81
2	0,17	0,17	15	0,8	0,83
3	0,21	0,23	16	0,83	0,81
4	0,42	0,4	17	0,85	0,86
5	0,44	0,46	18	1,03	1,07
6	0,56	0,56	19	1,06	1,06
7	0,58	0,61	20	1,17	1,19
8	0,6	0,59	21	2,53	2,58
9	0,68	0,72	22	2,55	2,61
10	0,73	0,77	23	2,75	2,74
11	0,74	0,75	24	3,13	3,17
12	0,75	0,79	25	3,16	3,21
13	0,77	0,75			

3.2 Metod Validasyon/Verifikasyon

Yağ örneklerinde 3-MCPD miktarının NIR cihazı kullanılarak kantitatif olarak tayininin gerçekleştiği metottur. “Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği” nde yağ numuneleri için limit değeri bulunmamaktadır. Metodun çalışma aralığı 0,3 mg/kg ile 5 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Bu metod için aşağıda belirtilen metod parametrelerinin verifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

- Tespit limiti
- Ölçüm limiti
- Doğruluk ve geri kazanım
- Tekrarlanabilirlik
- Tekrar üretilebilirlik

Metod verifikasyonu için örnek matriksi olarak zeytinyağı kullanılmıştır.

Metod 0,3 mg/kg ile 5 mg/kg konsantrasyon aralığında verifiye edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım çalışmaları için örnek matriks olarak kabul edilen zeytinyağına; 0,3 mg/kg ve 5 mg/kg düzeyinde 3-MCPD içerecek şekilde standarttan eklemeler yapıp analiz edilmiştir. Bu iki değişik 3-MCPD oranına sahip örnekler ile verifikasyon çalışmaları iki kişi tarafından 10 ayrı çalışma yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

Tespit ve ölçüm limiti tespitinde; ilk olarak örnek test edilmiş ve 3-MCPD tespit edilmemiştir. Son üründe yaklaşık 0,3 mg/kg düzeyinde 3-MCPD içerecek şekilde standarttan ekleme yapıp analiz yapılmıştır. Kullanılan yöntemde belirtilen işlem uygulandıktan sonra NIR’ da 10 kez analiz yapılarak standart sapması hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 3.3 ve Tablo 3.4 de verilmiştir. Aşağıdaki formüller kullanılarak LOD ve LOQ hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} : \text{SD} \times 3$$

$$\text{LOQ} : \text{SD} \times 10$$

$$\text{LOD} : \text{Tespit Limiti (Limit of Detection)}$$

LOQ : Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation)

SD : Standart Sapma (Standard Deviation)

Tablo 3.3 1.Analistin LOD- LOQ çalışma sonuçları

Analiz Sayısı	3-MCPD (mg/kg)
1	0,27
2	0,27
3	0,29
4	0,29
5	0,27
6	0,29
7	0,29
8	0,27
9	0,29
10	0,29
Ortalama	0,28
SD	0,01
%RSD	3,66
LOD	0,03
LOQ	0,10

Tablo 3.4 2.Analistin LOD- LOQ çalışma sonuçları

Analiz Sayısı	3-MCPD (mg/kg)
1	0,29
2	0,29
3	0,29
4	0,27
5	0,29
6	0,27
7	0,29
8	0,29
9	0,27
10	0,29
Ortalama	0,28
SD	0,01
%RSD	3,40
LOD	0,03
LOQ	0,10

LOQ değeri; çalışılan değerden düşük bulunduğundan metodun LOQ' su olarak çalışılan değer olan 0,3 mg/kg alınacaktır.

Tekrarlanabilirlik Sonuçları ve Değerlendirmesi

Düşük Konsantrasyon için;

Tablo 3.5 Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz Adı	3-MCPD (mg/kg)
Sonuçlar	0,27
	0,27
	0,29
	0,29
	0,27
	0,29
Ort	0,28
Sr	0,01
% RSD	3,91
Tekrarlanabilirlik limiti ($r = Sr \times 2,8$)	0,03
Mutlak Fark (Max-Min)	0,02
Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü	U
Horwitz % RSDr	12,7
Horratr	0,31
Horrat Uygunluk	U

Tablo 3.6 2. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçlar

Analiz Adı	3-MCPD (mg/kg)
Sonuçlar	0,29
	0,29
	0,29
	0,27
	0,29
	0,27
Ort	0,28
Sr	0,01
%RSD	3,65
Tekrarlanabilirlik limiti (r =Sr x 2,8)	0,03
Mutlak Fark (Max-Min)	0,02
Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü	U
Horwitz % RSDr	12,7
Horratr	0,29
Horrat Uygunluk	U

Yüksek Konsantrasyon için;

Tablo 3.7 1. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz Adı	3-MCPD (mg/kg)
Sonuçlar	4,88
	4,88
	4,91
	4,91
	4,88
	4,88
Ort	4,89
Sr	0,02
% RSD	0,32
Tekrarlanabilirlik limiti (r =Sr x 2,8)	0,04
Mutlak Fark (Max-Min)	0,03
Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü	U
Horwitz % RSDr	2,93
Horratr	0,11
Horrat Uygunluk	U

Tablo 3.8 2. Analistin elde ettiği tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz Adı	3-MCPD (mg/kg)
Sonuçlar	4,87
	4,87
	4,91
	4,91
	4,91
	4,87
Ort	4,89
Sr	0,02
%RSD	0,45
Tekrarlanabilirlik limiti (r =Sr x 2,8)	0,06
Mutlak Fark (Max-Min)	0,04
Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü	U
Horwitz % RSDr	2,93
Horratr	0,15
Horrat Uygunluk	U

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Horratr değeri ≤ 2 olduğundan sonuçlar uygundur. Analizin orijinal yönteminde zeytinyağında kesinlik parametresi için tekrarlanabilirlik limitleri verilmediğinden sonuçlar istatistiksel metotlar ile değerlendirilmiştir.

Tekrar Üretilirlik ve Geri Kazanım Sonuçları ve Değerlendirmesi

Düşük Konsantrasyon için;

Tablo 3.9 1. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım sonuçları

Analiz Sayısı	Teorik 3-MCPD (mg/kg)	Örnekte Bulunan 3-MCPD (mg/kg)	Analiz Sonucu Bulunan 3-MCPD (mg/kg)	Sonuç (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	0,30	0	0,27	0,27	90
2	0,30	0	0,27	0,27	90
3	0,30	0	0,29	0,29	97
4	0,30	0	0,29	0,29	97
5	0,30	0	0,27	0,27	90
6	0,30	0	0,29	0,29	97
7	0,30	0	0,29	0,29	97
8	0,30	0	0,27	0,27	90
9	0,30	0	0,29	0,29	97
10	0,30	0	0,29	0,29	97
Ortalama			0,28	0,28	94
SD			0,01	0,01	3,4
%RSD			3,7	3,7	3,7

Tablo 3.10 2. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirlik ve gerikazanım sonuçları

Analiz Sayısı	Teorik 3-MCPD (mg/kg)	Örnekte Bulunan 3-MCPD (mg/kg)	Analiz Sonucu Bulunan 3- MCPD (mg/kg)	Sonuç (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	0,30	0	0,29	0,29	97
2	0,30	0	0,29	0,29	97
3	0,30	0	0,29	0,29	97
4	0,30	0	0,27	0,27	90
5	0,30	0	0,29	0,29	97
6	0,30	0	0,27	0,27	90
7	0,30	0	0,29	0,29	97
8	0,30	0	0,29	0,29	97
9	0,30	0	0,27	0,27	90
10	0,30	0	0,29	0,29	97
Ortalama			0,28	0,28	95
SD			0,01	0,01	3,2
%RSD			3,4	3,4	3,4

Yüksek Konsantrasyon için:

Tablo 3.11 1. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirlik ve gerikazanım sonuçları

Analiz Sayısı	Teorik 3-MCPD (mg/kg)	Örnekte Bulunan 3-MCPD (mg/kg)	Analiz Sonucu Bulunan 3- MCPD (mg/kg)	Sonuç (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	5,0	0	4,88	4,88	98
2	5,0	0	4,88	4,88	98
3	5,0	0	4,91	4,91	98
4	5,0	0	4,91	4,91	98
5	5,0	0	4,88	4,88	98
6	5,0	0	4,88	4,88	98
7	5,0	0	4,88	4,88	98
8	5,0	0	4,88	4,88	98
9	5,0	0	4,88	4,88	98
10	5,0	0	4,91	4,91	98
Ortalama			4,89	4,89	98
SD			0,01	0,01	0,3
%RSD			0,3	0,3	0,3

Tablo 3.12 2. Analistin elde ettiği tekrar üretilebilirlik ve gerikazanım sonuçları

Analiz Sayısı	Teorik 3-MCPD (mg/kg)	Örnekte Bulunan 3-MCPD (mg/kg)	Analiz Sonucu Bulunan 3- MCPD (mg/kg)	Sonuç (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	5,0	0	4,87	4,87	97
2	5,0	0	4,87	4,87	97
3	5,0	0	4,91	4,91	98
4	5,0	0	4,91	4,91	98
5	5,0	0	4,91	4,91	98
6	5,0	0	4,87	4,87	97
7	5,0	0	4,87	4,87	97
8	5,0	0	4,87	4,87	97
9	5,0	0	4,91	4,91	98
10	5,0	0	4,91	4,91	98
Ortalama			4,89	4,89	98
SD			0,02	0,02	0,4
%RSD			0,4	0,4	0,4

Tablo 3.13 Elde edilen ortalama geri kazanım sonuçları

Teorik 3-MCPD (mg/kg)	Analiz sayısı	Ortalama Geri Kazanım (%)	S.Sapma	%RS D
0,3	10	94	3,4	3,7
0,3	10	95	3,2	3,4
15,0	10	98	0,3	0,3
15,0	10	98	0,4	0,4

Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Eser Elementler ve Bulaşan Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No: 2017/7)’ inde geri kazanım % 75-110 olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen ortalama geri kazanım sonuçları uygundur.

Tekrarüretilebilirlik sonuçları değerlendirilecek olur ise;

Tablo 3.14 Düşük konsantrasyon için tekrar üretilirlik sonuçları

Analiz	1. Analist	2. Analist
	3-MCPD (mg/kg)	3-MCPD (mg/kg)
1	0,27	0,29
2	0,27	0,29
3	0,29	0,29
4	0,29	0,27
5	0,27	0,29
6	0,29	0,27
7	0,29	0,29
8	0,27	0,29
9	0,29	0,27
10	0,29	0,29
Ortalama	0,28	
SR	0,01	
% RSD	3,46	
Horwitz % RSDR	19,2	
HorratR	0,18	
Horrat Uygunluk	U	

Tablo 3.15 Yüksek konsantrasyon için tekrar üretilebilirlik sonuçları

Analiz	1. Analist	2. Analist
	3-MCPD (mg/kg)	3-MCPD (mg/kg)
1	4,88	4,87
2	4,88	4,87
3	4,91	4,91
4	4,91	4,91
5	4,88	4,91
6	4,88	4,87
7	4,88	4,87
8	4,88	4,87
9	4,88	4,91
10	4,91	4,91
Ortalama	4,89	
SR	0,02	
% RSD	0,36	
Horwitz % RSDR	4,44	
HorratR	0,08	
Horrat Uygunluk	U	

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen HorratR değeri ≤ 2 olduğundan sonuçlar uygundur. Analizin orijinal yönteminde zeytinyağında kesinlik parametresi için uyarlık (tekrar üretilebilirlik) limitleri verilmediğinden sonuçlar istatistiksel metotlar ile değerlendirilmiştir.

Sapan Değerlerin Belirlenmesi

Grubbs Testi:

Tablo 3.16 Düşük konsantrasyon için grubbs testi

Parametreler	1. Analist Sonuçları	2. Analist sonuçları
Glow	1,16	1,45
Ghigh	0,77	0,62

Tablo 3.17 Yüksek konsantrasyon için grubbs testi

Parametreler	1. Analist Sonuçları	2. Analist sonuçları
Glow	0,62	0,95
Ghigh	1,45	0,95

% 95 güven aralığında n:10 çalışma için grubbs test limiti:**2.29'** dur. Yukarıdaki sonuçlar bu limit değerden küçük olduğundan sapan değer yoktur.

Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Bulunan sonuçların uygunluğu için ANOVA testi yapıldığında;

Tablo 3.18 Düşük konsantrasyon için anova testi sonuçları

Anova: Tek Etken						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
1.Analist	10	2,82	0,28	0,0001		
2.Analist	10	2,84	0,28	0,0001		
ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	2E-05	1	2E-05	0,20	0,66	4,41
Gruplar İçinde	0,002	18	1E-04			
Toplam	0,0018	19				

Tablo 3.19 Yüksek konsantrasyon için anova testi sonuçları

Anova: Tek Etken						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
1.Analist	10	48,9	4,89	0,0002		
2.Analist	10	48,9	4,89	0,0004		
ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	5E-06	1	5E-06	0,02	0,90	4,41
Gruplar İçinde	0,006	18	0,0003			
Toplam	0,006	19				

Hesaplanan F değeri, F ölçüt değerinden küçük olduğundan sonuçlar uygundur.

Verifikasyon Sonuçları:

Verifikasyon sonuçlarına göre metot performans değerleri

- Ortalama Geri kazanım (%) : 96
- Tekrarlanabilirlikte max % RSD : 3,7

(Analizi yapanların en yüksek sapmaya sahip değeri alınmıştır)

- Tespit Limiti (LOD) : 0,10 mg/kg
- Ölçüm Limiti (LOQ) : 0,30 mg/kg

Ölçüm Belirsizliği:

Yapılan verifikasyon çalışması sonucunda belirsizlik hesabı yapılmıştır. Ölçüm belirsizlik değeri % 95 güven aralığında k=2 için genişletilmiş belirsizlik değeridir ve % 8,5 olarak bulunmuştur.

3.3 Balkabağı Çekirdeği Yağı

3.3.1 Fizikokimyasal Özellikleri

Balkabağı çekirdeği yağı, protein, toplam karbonhidrat ve kuru madde içeriği sırasıyla %20,51, %38,75, %28,39 ve %9,40 olarak belirlenmiştir. PSO1, PSO2 ve PSO3 örneklerinin PV değeri sırasıyla 3,5, 4,17 ve 5,32 mEq O₂/kg'dı. Örneklerin FFA değerleri PSO1, PSO2 ve PSO3 için sırasıyla 3,86, 1,47 ve %1,34 olarak bulunmuştur. Letviany, Hariyadi, Andarwulan ve Purnomo'da (2020) benzer sonuçlar bildirmiştir. Petrolün çıkarılmasından önce ısıtma işleminin FFA seviyelerini artırdığını, ancak sıcaklık ve ısıtma süresinde azalma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Minimum FFA seviyesi 20 dakika boyunca 120°C'de ısıtıldığında ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda FFA içeriği de pres sıcaklığını 100°C'den 150°C'ye düştüğü zaman azaldı. Farklı pres sıcaklıklarının yağların FFA, PV ve indüksiyon süresi (IP) üzerindeki etkilerinin anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0.05). Pres sıcaklığının artmasıyla FFA azalırken, PV değeri önemli ölçüde arttı (p<0.05). Numunelerin PV değerlerindeki artış, peroksit ve ikinci oksidasyon ürünlerindeki artış ve antioksidan bileşenlerin azalması ile açıklanabilir. PSO1, PSO2 ve PSO3 örneğinin toplam tokoferol içeriği sırasıyla 596,01, 451,75 ve 414,14g / ml olarak tespit edilmiştir. Kabak çekirdeği yağının benzer toplam tokoferol içeriği sonuçları, Stevenson ve ark. (2007) tarafından 589,4-1234 mg/kg ve Benalia ve ark. (2015) çalışması tarafından 104,7-221,2 mg/kg olarak bildirilmiştir. Pres sıcaklığı arttıkça toplam tokoferol içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Soğuk pres koşullarına göre sırasıyla 100 °C ve 150 °C'de %13 ve %37 kayıp gözlenmiştir. Letviany ve arkadaşları (2020) ayrıca ekstraksiyon işleminden önce artan ısıtma sıcaklığı ile tokoferol içeriğinde azalma olduğunu bildirmiştir. Ekstraksiyondan önce ısıl işlemin tokoferol içeriği üzerindeki etkisi Bruscatto, Pestana-Bauer, Otero ve Zambiasi (2019) tarafından araştırılmıştır. Ayrıca artan sıcaklıkla birlikte tokoferol içeriğinde bir azalma α cinsinden olduğunu bildirmişlerdir. Tokoferol içeriği yağların oksidatif stabilitesinin belirlenmesinde çok önemlidir. Sonuçlar, presleme sırasında sıcaklık artışının hem sağlık açısından hem de yağın oksidatif stabilitesini azaltma açısından olumsuz etkilere neden olduğunu göstermektedir.

3.3.2 Sterol ve Yağ Asidi Bileşimleri

Steroller, bitkisel yağlarda, özellikle düşük halka kan kolesterol seviyeleri olmak üzere çeşitli sağlık etkileri olan biyoaktif bileşenlerdir. Presleme ve sonraki işlemlerde sterol kaybı, yağın biyoaktif özelliklerinde ve serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi gibi sağlık etkilerinde bir azalmaya yol açar. Tablo 3.20, farklı pres sıcaklıklarının kabak çekirdeği yağlarının toplam sterol ve sterol bileşimi üzerindeki etkisini göstermektedir. Örneklerin toplam sterol içeriği PSO1, PSO2 ve PSO3 için sırasıyla 2888, 2982 ve 2650 mg/kg olarak belirlendi. Pres sıcaklığının toplam sterol içeriği üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). 100 °C ve 50 °C (PSO1) sıcaklıklarında toplam sterol içeriği açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 150 °C'de pres sıcaklığında elde edilen toplam sterol içeriği 100 °C ve 50 °C'den (PSO1) önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Pres sıcaklığı 150 °C'ye yükseltildiğinde önemli sterol içeriği kaybı gözlenmiştir. Toplam sterol içeriğindeki önemli kayıp, ısı işlem etkisi ile sterollerin oksidasyon oranındaki artış ve sterollerin oksidasyon ürünlerine dönüşmesi ile açıklanabilir (Linve ark., 2017).

Tablo 3.20 PSO örneklerinin toplam sterol miktarı ve bireysel sterol bileşimleri

Sterols (%)	PSO1	PSO2	PSO3
B-Sitosterol+Spinasterol	48.69±0.229 ^a	47.77±0.224 ^b	46,56±0,221 ^c
Brassicasterol	Nd	0,08±0,004	Nd
Δ^{5-23} Stigmastadienol	Nd	Nd	Nd
Δ^{5-24} Stigmastadienol	22.77±0.414 ^a	22.18±0.351 ^a	22.45±0.38 ^a
Δ^5 Avenasterol	0,34±0,009 ^a	0,29±0,006 ^b	0,22±0,008 ^c
Δ^7 - Campesterol	5.86±0.636 ^a	4.43±0.578 ^a	3.02±0,619 ^b
Δ^7 Avenasterol	21.38±5.975 ^a	20,06±6,489 ^c	19.91±6,44 ^b
Δ^7 Stigmastenol	4.81±0.19 ^a	3.82±0.150 ^b	3.91±0.195 ^b
Eritrodiol+Uvaol	Nd	Nd	Nd
Campestanol	0,08±0,047 ^c	0,11±0,065 ^b	0,15±0,08 ^a
Campesterol	0,74±0,04 ^a	0,67±0,037 ^b	0,62±0,039 ^c
Clerosterol	0,37±0,046 ^a	0,034±0,043 ^b	0,37±0,045 ^a
Sitostanol	1.10±0.425 ^a	0,73±0,282 ^b	0,24±0,09 ^c
Stigmasterol	0,29±0,031 ^a	0,12±0,012 ^c	0,13±0,014 ^b
Δ^{7-9-11} Stigmastatrienol	0,236±0,021 ^b	0.300±0,177 ^a	0,301±0,177 ^a
24-metilen-cholesterol	0,06±0,001 ^b	0,07±0,022 ^a	0,07±0,022 ^a
Toplam Sterol	2888±38.521 ^b	2982±40.817 ^a	2667±67.125 ^c

*Aynı satırdaki farklı küçük harf, farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan numuneler arasındaki farkları gösterir (P<0.05). **PSO: kabak çekirdeği yağı, PSO1: soğuk preslenmiş PSO, PSO2: 100 °C'de sıcak preslenmiş PSO, PSO3: 150 °C'de sıcak preslenmiş PSO.

Bir çalışmada, sterollerin oksidasyon ürünlerinin oluşumu 150 °C, 180 °C ve 210 °C'de gözlenmiştir. Her sıcaklıkta sterol oksidasyon ürünlerinde önemli bir artış gözlenmiş ve sıcaklık artışı ile sterol oksidasyon ürünlerinin konsantrasyonunun artmıştır (Lin vd., 2017). Sterol oksidasyon ürünlerindeki artış ve sterol kaybı 100 °C'nin üzerindeki termal tedavilerle farklı çalışmalardan bildirilmiştir (Barriuso, Ansorena, Poyato, & Astiasarán, 2015; Chen vd., 2020; González-Larena vd., 2011; Kemmo, Ollilainen, Lampi, & Piironen, 2008). Sterol oksidasyon ürünlerinin sitotoksik etkileri olduğu ve termal tedavi ile oluşum oranının arttığı bildirilmiştir (Lin vd., 2017; O'Callaghan, McCarthy, & O'Brien, 2014). Bu çalışmanın sonuçları, 150 °C'deki pres sıcaklığının sterol içeriği açısından soğuk preslenmiş yağlardan beklenen sağlık etkilerini karşılamadığını göstermiştir.

β -Sitosterol+spinasterol, $\Delta^{7,25}$ Stigmastadienol ve Δ^7 Avenasterol başlıca steroller olarak tanımlandı. Spinasterol + β -sitosterol ve $\Delta^{7,25}$ stigmastadienol de Ogrodowska, Tanska ve Brandt (2017) tarafından en yaygın sterol olarak bildirilmiştir.

Benzer sterol kompozisyon sonuçları Rabrenovic, Vujasinovic, Novakovic, Corbo ve Basic (2016) ve Rabrenović, Dimić, Naovaković, Tešević ve Basić (2014) çalışmasından da bildirilmiştir. Pres sıcaklığının numunelerin sterol bileşimi üzerindeki etkisi sterol türüne göre değişmektedir. Pres sıcaklığının numunelerin Δ^{5-24} Stigmastadienol üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu tespit edilebilirken, pres sıcaklığının β -Sitosterol+spinasterol, Δ^7 Campesterol ve Δ^7 Avenasterol üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu tespit edildi.

Tablo 3.21 PSO örneklerinin yağ asidi bileşimi

Yağ asidi (%)	PSO1	PSO2	PSO3
C _{8:0}	Nd	Nd	Nd
C _{10:0}	Nd	Nd	Nd
C _{12:0}	Nd	Nd	Nd
C _{14:0}	0,052±0,007 ^a	0,048±0,002 ^b	0,045±0,001 ^b
C _{14:1}	Nd	Nd	Nd
C _{16:0}	11.01±0.10 ^b	11.56±0.11 ^a	11.54±0.02 ^a
C _{16:1}	0,15±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a
C _{18:0}	5.64±0.04 ^a	5,04±0,02 ^b	5.01±0.13 ^b
C _{18:1}	31.82±0.19 ^a	29.16±0.11 ^b	29.30±0.21 ^b
C _{18:2}	50,54±0,21 ^b	53.48±0.33 ^a	53.38±0.26 ^a
C _{18:3}	0,45±0,01 ^a	0,29±0,02 ^b	0,13±0,02 ^c
C _{20:0}	0,18±0,02 ^a	0,13±0,01 ^b	0,11±0,00 ^c
C _{20:1}	0,09±0,00 ^b	0,09±0,00 ^b	0,11±0,00 ^c
C _{22:0}	0,11±0,00 ^b	0,92±0,01 ^a	0,90±0,07 ^a
C _{22:1}	Nd	Nd	Nd
Σ_{SFA}	16.99±0.07 ^b	17.69±0.16 ^a	17.60±0.02 ^a
Σ_{UFA}	83.01±0,03 ^a	82.31±0.48 ^b	82.39±0.52 ^b
Σ_{PFA}	50,99±0,22 ^b	53.77±0.36 ^a	53.11±0.29 ^a
Toplam Trans	Nd	Nd	Nd

*Aynı satırdaki farklı küçük harf, farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan numuneler arasındaki farkları gösterir (P<0.05). **PSO: kabak çekirdeği yağı, PSO1: soğuk preslenmiş, PSO2: 100 °C'de preslenmiş, PSO3: 150 °C'de preslenmiş

Pres sıcaklığının yağ asidi bileşimi üzerindeki etkisi Tablo 3.21'de gösterilmiştir. Pres sıcaklığının etkisinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Linoleik, oleik ve palmitik asit tüm örneklerde başlıca yağ asitleriydi. Daha önce yayınlanan çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzer bulgular elde edilmiştir (Akın, Arslan, Karuk Elmas, & Yılmaz, 2018; Begić vd., 2020). Pres sıcaklığı arttıkça linoleik asit içeriği arttı ve oleik asit içeriği azalmıştır. Sıcaklığın toplam doymuş yağ asidi üzerindeki etkisi önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0.05$).

Herhangi bir yağ örneğinde trans yağ asidi bulgusuna rastlanmamıştır. Bu sonuçlar, yüksek pres sıcaklığının yağ asidi bileşimi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını ve trans yağ asitlerinin oluşumuna neden olmadığını göstermiştir.

3.3.3 Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Bileşim Değişimleri

Tablo 3.22, farklı pres sıcaklıklarının TPC, fenolik profil ve kabak çekirdeği yağı örneklerinin antioksidan kapasite değerleri üzerindeki etkisini göstermiştir. Örneklerin TPC değerleri PSO1, PSO2 ve PSO3 için sırasıyla 584,07, 298,5 ve 373,23 mg/l olarak belirlendi. Tablo 3.22'e göre, uygulanan pres sıcaklığı numunelerin TPC ve DPPH değerini önemli ölçüde azalttı ($p<0.05$). TPC, 100 °C pres sıcaklığı uygulaması ile elde edilen örneklerle (PSO2) kıyasla kontrol örneklerinden (PSO1) yaklaşık iki kat daha fazla azaldığı görülmüştür. Isıl işlem uygulanarak TPC'deki dramatik azalma, yüksek sıcaklık pres koşulları nedeniyle fenolik bileşiklerin bozulması ile açıklanabilir. Bitkisel yağların fenolik içeriği oksidatif stabiliteye, duyuusal özelliklere, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-kanserojen özelliklere önemli bir katkıya sahiptir. Isıl işlem uygulaması ile yağdaki fenolik bileşiklerin bozulması, yağların bu biyoaktif özelliklerinin azalmasına yol açmıştır. Isıl işlem uygulanarak DPPH değerindeki değişim TPC değerindeki değişime benzediği görülmüştür. Isıl işlem ile numunelerin antioksidan kapasite değeri önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$).

Tablo 3.22 TPC, DPPH Ve PSO örneklerinin bireysel fenolik bileşimleri

Fenolik Bileşikler	PSO1	PSO2	PSO3
	mg/kg		
3,4 Dimetoksi Benzaldehit	2.765±0,09 ^a	2.225±0,10 ^b	2.295±0,09 ^b
4-OH Benzoik Asit	6.175±0,14 ^a	2.752±0,21 ^b	1.650±0,14 ^b
Kafeik Asit	2.675±0,02 ^a	1.570±0,07 ^c	2.045±0,06 ^b
Kateşin	3.230±0,04 ^a	3.325±0,45 ^a	3.055±0,01 ^b
Ellajik Asit	0,832±0,04 ^a	0.725±0,03 ^b	0,537±0,03 ^c
Epigallokateşin	1.013±0,02 ^a	Nd	0.305±0,01 ^b
Ferrülik Asit	8.583±0,25 ^a	5.310±0,35 ^b	5.025±0,03 ^b
Kemferol	3.297±0,56 ^a	2.432±0,09 ^b	1.597±0,13 ^c
Luteolin	1.381±0,26 ^a	1.182±0,25 ^b	1.131±0,04 ^b
p-Kolomarik Asit	4.906±0,15 ^a	4.375±0,24 ^b	4.006±0,01 ^c
Protocatechuic Asit	2.282±0,11 ^a	0,925±0,17 ^c	1.382±0,03 ^b
Trans-Sinamik Asit	11.667±0,45 ^a	7.978±0,67 ^b	4,56±0,09 ^c
Vanilik Asit	4.840±0,19 ^a	3.042±0,11 ^b	2.915±0,09 ^b
TPC (mg GAE/g özü)	584. 07±8.37 ^a	298,50±5,94 ^c	373.23±5,98 ^b
DPPH (mmol TE/g özü)	28.55±1.05 ^a	16.82±0.75 ^b	14.74±0.55 ^b

* Aynı satırdaki farklı küçük harf, farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan numuneler arasındaki farkları gösterir (P<0.05). **PSO: kabak çekirdeği yağı, PSO1: soğuk preslenmiş PSO, PSO2: 100 °C'de sıcak preslenmiş, PSO3: 150 °C'de sıcak preslenmiş. *** TPC: Toplam fenolik içerik, DPPH: 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl antioksidan yöntemi.

Tablo 3.22, TPC'ye ek olarak fenolik bileşiklerin dağılımını göstermektedir. Kabak çekirdeği yağlarında 14 farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir. Fenolik asitler yani trans-sinamik asit, şıringik asit, p-kumarik asit ve vanillik asitleri sırasıyla en yaygın fenolik bileşikler olarak belirlenmiştir. Protokatekuik asit ve kafeik asit ve flavonoidler yani kateşin ve kaempferol gibi diğer fenolik asitler 1 mg/kg'dan yüksek olarak belirlenmiştir. Fenolik asitlerin miktarı ve dağılımı, Akın ve ark. (2018) tarafından bildirilen çalışmaya benzer olduğu görünmüştür. Çalışmalarında şıringik asidi ve ferulik asit majör fenolik asit olarak belirlenmiş ve içerikleri yaptığımız çalışmanın sonuçlarına benzer olduğu görünmüştür. Tablodan da görülebileceği gibi, sıcaklığın artışı ile fenolik bileşiklerin çoğunun miktarlarında önemli bir azalma gözlenmiştir. Sinamik asit, şıringik asit ve ferulik asit miktarı, sıcaklık 150 ° C'ye yükseldikçe sırasıyla %60, % 46 ve % 42 oranında azaldı. Epigallokateşin ise PSO2 numunesinde 100 °C'de ısı uygulaması ile tespit edilemedi ve bu da uygulanan ısıl işlemin epigallokateşin 'de tam bozulmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın bu sonuçları, yağın polar biyoaktif bileşiklerinin bozulmuş olduğunu ve ısıl işlem uygulamasıyla yağların biyoaktif özelliklerinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

3.3.4 In-vitro Sitotoksiklik Analizi

Kabak çekirdeği, çok zengin nutrasötik ve farmasötik özellikleri nedeniyle birçok farmakolojik etki ve sağlık yararı sağlar. Son yıllarda yapılan çeşitli in vitro, in vivo ve klinik öncesi çalışmalar, kabak çekirdeği yağının çok çeşitli olağanüstü biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Lestari & Meiyanto, 2018). Kabak çekirdeği yağı, doymamış yağ asitleri, steroller ve tokoferollerin yüksek içeriği nedeniyle bazı hastalıklara karşı koruyucudur (Patel, 2013).

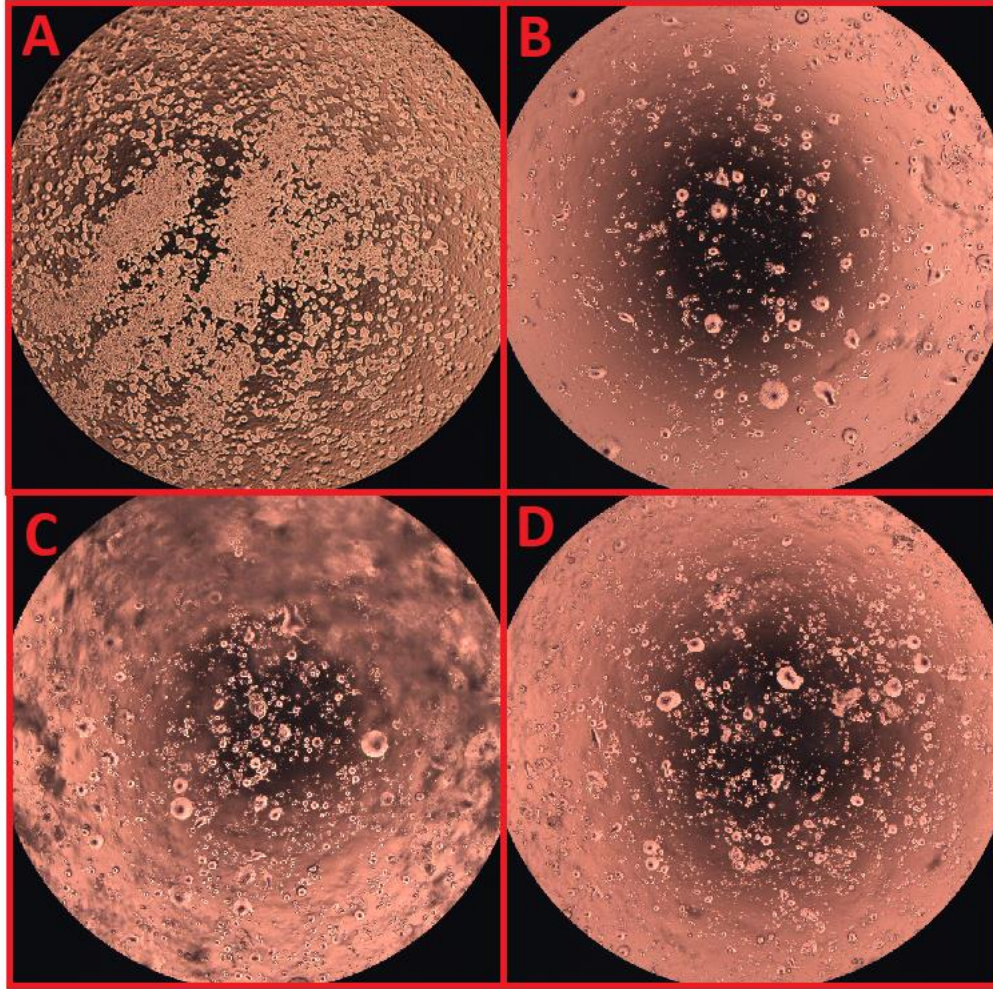
Bu çalışmada, kabak çekirdeği yağının Caco-2 adenokarsinom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmış ve PSO1, PSO2 ve PSO3 örneklerinin, 30 mg/ml 'sin de hücre inhibisyon değerlerine baktığımız zaman sırasıyla % 75, %48 ve %39 inhibisyon oranına sahip olduğu görünmüştür (Tablo 3.23).

Tablo 3.23 PSO örneklerinin Caco-2 adenokarsinom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Örnek miktar	Caco-2 hücre canlılığı (%)		
	PSO-1	PSO-2	PSO-3
30 mg/mL	25,01±0,93 ^c	52,76±3,72 ^b	61.71±1.10 ^a
25 mg/mL	25,64±1,03 ^c	58,86±4,35 ^b	66,57±5,59 ^a
20 mg/mL	29,40±0,39 ^c	68.32±0.99 ^b	84.90±1.23 ^a
15 mg/mL	32.25±0.20 ^c	81,86±3,45 ^b	94.15±0.45 ^a
10 mg/mL	46,89±1,53 ^c	89.26±4.52 ^b	97.06±0,62 ^a
5 mg/mL	63,54±5,50 ^c	96,54±0,82 ^b	99.37±0.28 ^a
2,5 mg/mL	70,78±2,04 ^b	99.59±0.26 ^a	99.46±0.95 ^a
1 mg/mL	87.11±0.43 ^b	99.46±0.28 ^a	99.52±0.25 ^a

* Aynı satırdaki farklı küçük harf, farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan numuneler arasındaki farkları gösterir (P<0.05). **PSO: kabak çekirdeği yağı, PSO1: soğuk preslenmiş PSO, PSO2: 100 °C'de sıcak preslenmiş, PSO3: 150 °C'de sıcak preslenmiş.

PSO2 ve PSO3,10 mg/ml'nin altındaki konsültasyonlarda önemli ölçüde etkili olmasa da, PSO 1 daha yüksek fenolik içeriği nedeniyle farklı seviyelerde inhibe etmeye devam etti. PSO1'in PSO2 ve PSO3'e kıyasla çok daha yüksek miktarda trans-cinnamik asit, benzoik asit ve protocatechuic asit içermesi, antikansorejen etkisini artırdı görünmektedir (Babich, Sedletcaia, & Kenigsberg, 2002; Pontiki, Hadjipavlou-Litina, Litinas, & Geromichalos, 2014) .



Şekil 3.3 PSO örneklerinin 30 mg/ml'si ile tedavi edilen Caco-2 hücrelerinin ters mikroskop görüntüleri (Olympus BX53)

*PSO1 ile tedavi edilen A-control hücreleri (PSO olmadan), PSO1 ile tedavi edilen B-cell'ler, PSO2 ile tedavi edilen C-cell'ler ve PSO3 ile tedavi edilen D-cell'ler.

Benzer bir araştırmada Richter ve ark., kabak çekirdeği yağının insan meme kanseri hücreleri (MCF7) ve insan koryonik karsinom hücre hatları (Jeg3 ve BeWo) üzerindeki antikanser etkisini incelemiş ve bu hücreler üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu bulmuştur. Medjakovic, Hobiger, Ardjomand-Woelkart, Bucar ve Jungbauer (2016) tarafından bildirilen başka bir in vitro çalışmada, hidroalkolik kabak çekirdeği özü kanser hücrelerinin çoğalmasını ve hiperplastik hücreleri inhibe ettiği görünmüştür. Ayrıca, bir hayvan çalışmasında, kabak çekirdeği yağı, iyi huylu prostat hiperplazisinin (Gossell-Williams, Davis, & O'Connor, 2006) yönetimini sağlayabilecek sıçanlarda testosteron kaynaklı hiperplaziyi inhibe ettiği raporlanmıştır. Friederich, Theurer ve Schiebel-Schlosser (2000) ve Hong, Kim ve Maeng (2009) tarafından yapılan klinik çalışmalarda, kabak çekirdeği yağı iyi huylu prostat kanseri (BPH) hastalarının 3 aylık diyetine dahil

edildi ve semptomlar özellikle kanserin erken evresinde azaldığı gözlenmiştir. Genel olarak, kabak çekirdeğinin kanser önleyici moleküler mekanizması birçok kanser hücresi türüne inhibe etkisi olduğu görünmektedir ve daha detaylı incelenmesinde fayda olduğu görünmektedir.

3.3.5 Antienflamatuvar Aktivite

İnflamasyon genellikle damar dokularındaki zararlı uyaranlara karşı karmaşık bir biyokimyasal reaksiyon olarak tanımlanır. Öte yandan, iltihap ağrı ile ilgilidir ve protein denatürasyonundaki artışla kendini gösterir (Ferrero-Miliani, Nielsen, Skytt Andersen, & Girardin, 2007). Antienflamatuvar ürünler, iltihaplanma ve rahatsızlığı azaltmak için kullanılan maddelerdir. (Bao, John, Chen, Mathison, & Weaver, 2006). Kabak çekirdeği geleneksel olarak birçok ülkede iltihap hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Ratnam, Vandana, Najibullah, & İbrahim, 2017). Tablo 3.24 'te PSO örneklerinin anti-inflamatuvar aktivitesi verilmiştir.

Tablo 3.24 Protein denatürasyon tahlili ile incelenen pso örneklerinin göreceli antienflamatuvar aktivitesi.

Numune miktarı (µg/mL)	Antienflamatuvar aktivite (%)		
	PSO-1	PSO-2	PSO-3
100	79.01±2.73 ^a	58,52±3,53 ^c	59.26±0,37 ^b
75	71.73±1.50 ^a	55.19±1.11 ^b	54.57±2.52 ^b
50	65.43±1.40 ^a	51.11±1.61 ^b	50.12±1.19 ^b
25	59,63±1,34 ^a	49,51±4,53 ^b	49,88±4,21 ^b

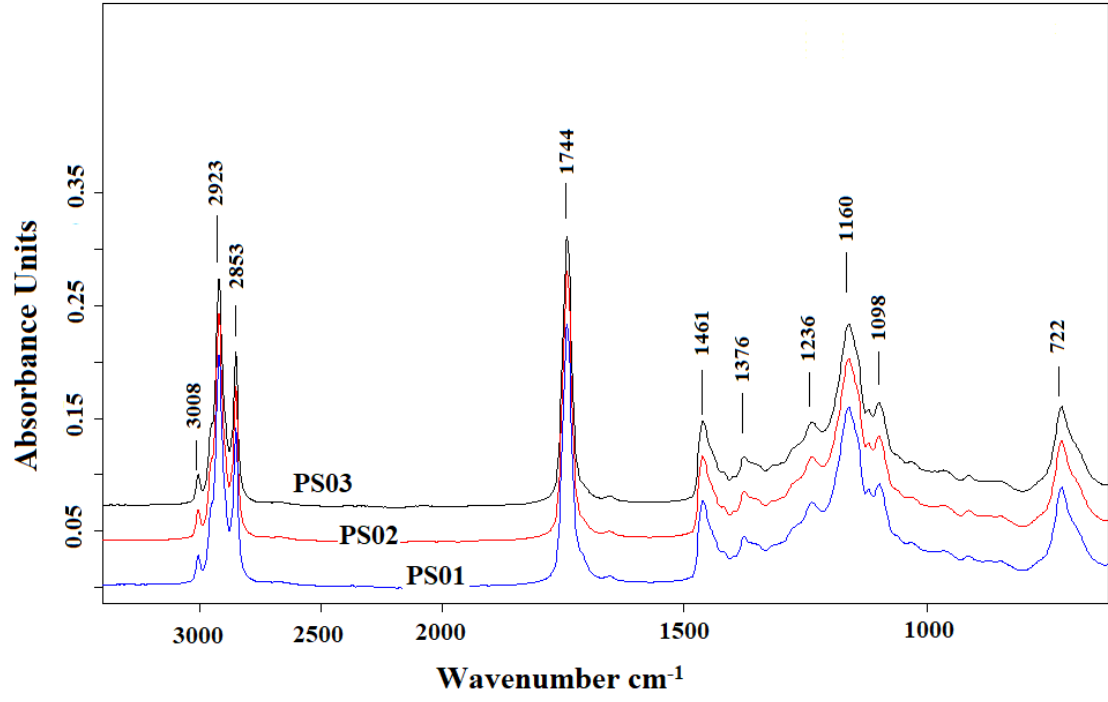
* Aynı satırdaki farklı küçük harf, farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan numuneler arasındaki farkları gösterir (P<0.05). **PSO: kabak çekirdeği yağı, PSO1: soğuk preslenmiş PSO, PSO2: 100 °C'de sıcak preslenmiş, PSO3: 150 °C'de sıcak preslenmiş.

Protein denatürasyon analizinde, tüm örnekler farklı seviyelerde inhibisyon seviyeleri % olarak gösterilmiştir. Tablo 3.24 incelendiği zaman PSO1 antienflamatuvar aktivitenin % 79 ile % 59 arasında değiştiğini gösterirken, aynı konsantrasyonlarda PSO2 ve PSO3 yaklaşık % 58 ile % 49 arasında değiştiği görünmüştür. En yüksek antienflamatuvar etki PSO1 örneğinin 100 µg/mL konsantrasyonda gözlenmiştir.

Bu etkinin PSO1'in PSO2 ve PSO3'e kıyasla fenolik içeriğinin daha yüksek olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, PSO2 ve PSO3 örnekleri arasında önemli bir fark tespit edilememiştir. Yerli ve hibrid kabak çekirdeği yağlarının antienflamatuvar aktivitesi Amin, Rity, Uddin, Rahman ve Uddin (2020) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, yerli kabak çekirdeği yağının hibrit bir örnek ile kıyasla 45 µg/mL konsantrasyonda % 89 oranında daha yüksek bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Başka bir in vivo çalışmada, Mısır ve Avrupa çeşidinin kabak çekirdeği yağlarının anti-enflamatuvar aktivitesi, bir sıçan modelinde incelendi ve soğuk pres yöntemi ile elde edilen yağların iltihabı önemli ölçüde azalttığı görünmüştür (Al-Okbi ve ark., 2017). Benzer şekilde Arslanbaş, Kara, Karayığit, Doğan ve Yıldız (2020) da sıçan ödem modelinde Türkiye kaynak kabak çekirdeği yağının antienflamatuvar aktivitesini incelediler ve Türkiye kaynaklı PSO (Soğuk pres, 100 mg/kg) dozajının yüksek olduğu grupta önemli bir antienflamatuvar etki olduğunu gözlemlediler. Sonuç olarak, PSO iltihabı kontrol etmek için çok etkili bir ajan olduğu ve iltihapla ilgili birkaç kronik hastalığın tedavisinde kullanılabilir olduğu görünmektedir.

3.3.6 FTIR Spektrometrik Analizi

Pres sıcaklıklarındaki farklılıklarının biyoaktif bileşenlere etkilerini tespit etmek için alternatif ve pratik bir yöntem olarak FTIR analizi de yapılmıştır. PSO1, PSO2 ve PSO3 numuneleri her biri ayrı ayrı kızılötesi spektrumları, 4 cm⁻¹ çözünürlükte 4000 ile 600 cm⁻¹ arasında değişen dalga boyunda kaydedildi ve spektrum başına 16 tarama yapılarak toplandı. Şekil 3.1 de görüldüğü gibi yapılan çalışmada PSO1, PSO2 ve PSO3 numuneleri arasında anlamlı bir farklılık görünmemiştir. FTIR analizinin temel çalışma prensibi olarak pikler arasında ayırt edici bir farklılıkların tespit edilmesi önemlidir.



Şekil 3.4 PSO1, PSO2 ve PSO3 yağ örneklerinin FTIR spektrumları

SONUÇ VE ÖNERİLER

3-MCPD, serbest formunda, farklı yağ asitleri ile ester formunda veya her iki formda da gıdalarda sıklıkla bulunan bir bileşiktir. 3-MCPD bileşiği, tahıl ürünleri, kahve, bebek maması, yemeklik sıvı ve katı yağlar gibi diğer birçok gıda maddesinde, yaygın olarak mono- veya di-esterleri şeklinde bulunmuştur. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinin (2016) bilimsel görüşüne göre, esterlerden en yüksek 3-MCPD seviyeleri ($> 5.210 \mu\text{g} / \text{kg}$) palm yağlarında bulunduğunu, ancak çoğu bitkisel sıvı ve katı yağlar da önemli miktarda içerdiğini bildirmektedir (Baer vd., 2010; Habermeyer vd., 2011; Jedrkiewicz vd., 2016; Schilter vd., 2011). Günlük diyetle ekmek, erişte, et, kek ve bisküvi gibi büyük miktarlarda yenen gıdaların 3-MCPD alımına önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmektedir. Bu gıdalarda yüksek alım, üründe yüksek bir 3-MCPD seviyesinden ziyade yenen miktardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca sosis kılıfları, çay poşetleri, kahve filtresi gibi gıda kaplama malzemelerinde sıklıkla bulunan anahtar bileşik epiklorhidrin de gıdaları etkileyebilir ve 3-MCPD bu tip kaplama malzemeleriyle temas eden gıdalarda da ortaya çıkabilir. Dolayısıyla, 3-MCPD'nin, sadece düşük seviyelerde mevcut olmalarına rağmen, bu kontaminantı içeren yiyeceklerin çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda kaçınmanın zor olduğu görülmekte ve tüketiciler zaman zaman kısa bir süre için yüksek seviyelerde 3-MCPD'ye maruz kalabilmektedir (Baer vd., 2010; Chung vd., 2008)

Yağlarda 3-MCPD analizi uzun ve maliyetli bir analizdir. Mevcut referans yöntemlere göre Gc-Ms yöntemi ile yapılması gerekmektedir. Ancak Avrupa ülkelerinde regülasyonları oluşturulmuş olup, yakın zamanda ülkemizde de düzenlemeleri yapılacak olan 3- mcpd miktarı, proses analizi uygulamaları kapsamında olacaktır. Bu nedenle fabrika uygulamalarında her parti üründe analiz sonucuna ihtiyaç duyulacaktır.

Gc-Ms ile bu kadar analizin, günlük olarak yapılıp, üretimi yönlendirebilmesi pratikte mümkün görünmemektedir.

Bu neden dolayı, daha hızlı ve maliyet açısından daha ekonomik yollara ihtiyaç duyulmaktadır. NIR teknolojisi şu aşamada en alternatif yöntem görünmektedir. NIR, genel prensip olarak 15-90 s aralığında analiz sonucu vermesi, herhangi bir kimyasal

sarfin olmaması ve kalibrasyon işlemi yapılıp, metodun valide edilmesi sonrası kullanım noktasında uzmanlık gerektirmemesi gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

NIR ile yapılan Verifikasyon sonuçlarına göre metot performans değerleri; Ortalama Geri kazanım %96, Tekrarlanabilirlikte max % RSD : 3,7 olarak hesaplanmış ve Tespit Limiti (LOD) : 0,10 mg/kg , Ölçüm Limiti (LOQ): 0,30 mg/kg olarak bulunmuştur. Yapılan verifikasyon çalışması sonucunda belirsizlik hesabı yapılmıştır. Ölçüm belirsizlik değeri %95 güven aralığında $k=2$ için genişletilmiş belirsizlik değeridir ve % 8,5 olarak bulunmuştur.

Bu veriler ışığında yapılan verifikasyon çalışması sonuçları NIR ile yapılan 3-MCPD kalibrasyonun etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Proses analizleri sırasında üretim basamaklarında kullanılabilir, hızlı ve maliyet anlamında kıymetli avantajları olan, kullanımı kolay alternatif bir analiz metodu olduğu görülmektedir.

İkinci çalışma olan soğuk pres yağları son yıllarda sağlığa olumlu etkileri nedeniyle tüketicilerin dikkatini çeken ürünler haline gelmiştir. Soğuk pres yağı üretimi sırasında yüksek sıcaklık uygulanmaz ve yağ içeriğindeki besin elementleri korunur. Bununla birlikte, üreticiler verimliliği artırmak için yüksek sıcaklıklar uygulayarak yağın bileşimini değiştirmektedirler Bu çalışmada ısı uygulamasının mekanik preslerle üretilen yağların biyoaktif özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu etkilerin hızlı ve pratik bir yöntem olan FTIR yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yüksek pres sıcaklığı, sterol, tokoferol ve fenolik bileşiklerin miktarında, sitotoksikliğin azalmasında ve örneklerin anti-enflamatuar özelliklerinde önemli bir azalmaya neden oldu. Bu çalışmanın sonuçları, yüksek pres sıcaklığının yağın biyoaktif özelliklerinde önemli değişikliklere neden olabileceğini ve yüksek pres sıcaklıkları uygulanarak üretilen yağların soğuk pres koşullarında üretilen yağların özelliklerini karşılayamadığını belirlenmiştir. Ayrıca yapılan FTIR çalışmalarında kabak çekirdeği yağında bulunan biyoaktif bileşenlerin sıcaklık değişimlerini tespit etme noktasında anlamlı farklılıklar bulunmadığı tespit edilmiştir.

- Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., & Lampen, A. (2013). Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Archives of Toxicology*, 87(4), 649-659.
- Akcicek, A., & Karasu, S. (2018). Utilization of cold pressed chia seed oil waste in a low-fat salad dressing as natural fat replacer. *Journal of Food Process Engineering*, 41(5), e12694. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpe.12694>
- Akin, G., Arslan, F., Karuk Elmas, S., & Yilmaz, I. (2018). Cold-pressed pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) oils from the central Anatolia region of Turkey: Characterization of phytosterols, squalene, tocopherols, phenolic acids, carotenoids and fatty acid bioactive compounds. *Grasas y Aceites*, 69, 232. doi:10.3989/gya.0668171
- Al-Okbi, S. Y., Mohamed, D. A., Kandil, E., Abo-Zeid, M. A., Mohammed, S. E., & Ahmed, E. K. (2017). Anti-inflammatory activity of two varieties of pumpkin seed oil in an adjuvant arthritis model in rats. *Grasas y Aceites*, 68(1), e180. doi:10.3989/gya.0796161
- Amin, M. Z., Rity, T. I., Uddin, M. R., Rahman, M. M., & Uddin, M. J. (2020). A comparative assessment of anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial activities of hybrid and indigenous varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.) seed oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101767. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101767>
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis (15th Ed.). In The Association of Official Analytical Chemists (pp. 1298). Arlington, VA, USA.
- Arisseto, A.P., Marcolino, P.F.C., Augusti, A.C., Scaranelo, G.R., Berbari, S.A.G., Miguel, A.M.R.O., Morgano, M.A., Vicente, E. (2017). Contamination of fried foods by 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters during frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94, 449-455.
- Arisseto, A.P., Marcolino, P.F.C., Vicente, E. (2015). 3-Monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in commercial deep-fat fried foods. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32(9), 1431-1435.
- Arslanbaş, E., Kara, H., Karayigit, O. M., Doğan, H., & Yildiz, Ş. (2020). Anti-inflammatory activity of Turkey source pumpkin seed oil in rat oedema model. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 77, 305-312. doi:10.32383/appdr/118962
- Aske N, Kallevik H, Sjoblom J. 2001. Determination of saturate, aromatic, resin, and asphaltenic (SARA) components in crude oils by means of infrared and near-infrared spectroscopy. *Energy Fuels* 15 (5): 1304-1312.
- Babich, H., Sedletcaia, A., & Kenigsberg, B. (2002). In Vitro Cytotoxicity of Protocatechuic Acid to Cultured Human Cells from Oral Tissue: Involvement in Oxidative Stress. *Pharmacology & Toxicology*, 91(5), 245-253. doi:<https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2002.910505.x>
- Baer, I., De La Calle, B., & Taylor, P. (2010). 3-MCPD in food other than soy sauce or hydrolysed vegetable protein (HVP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 443-456.

- Bajcsy, R., Lee, S.W., Leonardis, A. (1996). Detection of diffuse and specular interface reflections and inter-reflectance by color image segmentation. *International Journal of Computer Vision*, 17(3), 241-272.
- Bakhiya, N., Abraham, K., Gürtler, R., Appel, K. E., & Lampen, A. (2011). Toxicological assessment of 3-chloropropane-1, 2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Molecular nutrition & food research*, 55(4), 509-521.
- Balage, J. M.; da Luz e Silva, S.; Gomide, C. A.; Bonin, M. d. N.; Figueira, A. C., Predicting pork quality using Vis/NIR spectroscopy, *Meat Science*, 108, 37-43, **2015**.
- Bao, F., John, S. M., Chen, Y., Mathison, R. D., & Weaver, L. C. (2006). The tripeptide phenylalanine-(d) glutamate-(d) glycine modulates leukocyte infiltration and oxidative damage in rat injured spinal cord. *Neuroscience*, 140(3), 1011-1022. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.061
- Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J., Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra, *Applied Spectroscopy*, 43, 772-777, **1989**.
- Barriuso, B., Ansorena, D., Poyato, C., & Astiasarán, I. (2015). Cholesterol and stigmaterol within a sunflower oil matrix: Thermal degradation and oxysterols formation. *Steroids*, 99, 155-160. doi:https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.009
- Begić, M., Nezirević-Nizić, E., Čorbo, S., Podrug, S., Asimovic, Z., & Muminović, Š. (2020). Fatty Acid Composition and Stability of Cold-Pressed Vegetable Oils. In (pp. 303-312).
- Blanco, M., Villarroya, I.N.I.R. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), 240- 250.
- Breitling-Utzmann, C. M., Hrenn, H., Haase, N. U. and Unbehend, G. M. (2005). Influence of dough ingredients on 3-chloropropane-1,2-diol (3- MCPD) formation in toast. *Food Addit. Contam.* 22(2):97–103.
- Breitling-Utzmann, C. M., Kobler, H., Harbolzheimer, D. and Maier, A. (2003). 3-MCPD: Occurrence in bread crust and various food groups as well as formation in toast. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 99(7):280–285.
- Burns, D. A.; Ciurczak, E. W., *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*. CRC Press;**2007**.
- Calta P, Velisek J, Dolezal M, Hasnip S, Crews C, Reblova Z (2004) Formation of 3-chloropropane-1,2-diol in systems simulating processed foods. *Eur Food Res Tech* 218(6):501–506
- Cen H, He Y. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Tech* 18 (2): 72-83.
- Cerbulis, J., Parks, O. W., Liu, R. H., Piotrowski, E. G., & Farrell Jr, H. M. (1984). Occurrence of diesters of 3-chloro-1, 2-propanediol in the neutral lipid fraction of goats' milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), 474-476.
- Chen, H.; Tan, C.; Lin, Z.; Wu, T., Classification and quantitation of milk powder by near-infrared spectroscopy and mutual information-based variable selection and partial least squares, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 189, 183-189, **2018**.

- Chen, J., Li, D., Tang, G., Zhou, J., Liu, W., & Bi, Y. (2020). Thermal-Oxidation Stability of Soybean Germ Phytosterols in Different Lipid Matrixes. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25. doi:10.3390/molecules25184079
- Cho, W. S., Han, B. S., Lee, H. and Kim, C. (2008). Subchronic toxicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol administered by drinking water to B6C3F1. *Food Chem. Toxicol.* 46:1666–1673.
- Chon, S. H., Zhou, Y. X., Dixon, J. L., & Storch, J. (2007). Intestinal monoacylglycerol metabolism developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33346-33357.
- Chung SWC, Kwong KP, Yau JCW, Wong AMC, Xiao Y (2008) Chloropropanols levels in foodstuffs marketed in Hong Kong. *J Food Compos Anal* 21(7):569–573
- Collier PD, Cromie DDO, Davies AP (1991) Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Am Oil Chem Soc* 68(10):785–790
- Contal, L., Leon, V., Downey, G. (2002). Detection and quantification of apple adulteration in strawberry and raspberry purees using visible and near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(4), 289-299.
- Cozzolino, D., Murray, I. (2003). Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37(4), 447-452.
- Crews, C., Brereton, P. and Davies, A. (2001). The effects of domestic cooking on the levels of 3-monochloropropanediol in foods. *Food Addit. Contam.*, 18:271–280.
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Harvey, D. and Matthews, W., (2001). Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food groups. *Food Addit. Contam.* 19:22–27.
- Çağlar, M. Y., Demirci, M., Şahiner, A., Çakır, B., & Çağlar, A. F. (2019). Gıda Analizlerinde Kullanılan Spektroskopik Teknikler. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 17(1).
- Davidek J, Velisek J, Kubelka V, Janicek G, Simicova Z (1980) Glycerol chlorohydrins and their esters as products of the hydrolysis of tripalmitin, tristearin and triolein with hydrochloric acid. *Z Lebensm Unters Forsch* 171(1):14–17
- de la Roza-Delgado, B., Garrido-Varo, A., Soldado, A., Arrojo, A. G., Valdés, M. C., Maroto, F., & Pérez-Marín, D. (2017). Matching portable NIRS instruments for in situ monitoring indicators of milk composition. *Food Control*, 76, 74-81.
- DeJong, S. A., Lu, Z., Cassidy, B. M., O'Brien, W. L., Morgan, S. L., & Myrick, M. L. (2015). Detection limits for blood on four fabric types using infrared diffuse reflection spectroscopy in mid-and near-infrared spectral windows. *Analytical chemistry*, 87(17), 8740-8747.
- Divinova, V., Dolezal, M. and Velisek, J. (2007). Free and Bound 3-Chloropropane- 1,2-diol in coffee surrogates and malts. *Czech J. Food Sci.* 25:39– 47.
- Dolezal, M., and Velisek, J., (1992), Kinetics of 3-chloro-1,2-propanediol degradation in model systems. *Proceedings of Chemical Reactions in Foods II*, Prague, Czech Republic, 24-26 September, pp. 297-302.

- Dolezal, M., and Velisek, J., 1995, Kinetics of 2-chloro-1,3-propanediol in model systems and in protein hydrolysates. *Potravinaoske Vedy*, 2, 85-91.
- Dolezal, M., Chaloupska, M., Divinova, V., Svejkskova, B. and Velisek, J. (2005). Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol and its esters in coffee. *Eur. Food Res. Technol.* 221:221–225.
- Dyshlyuk, L., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Pavsky, V., & Yang, Y. (2017). In vivo study of medical and biological properties of functional bakery products with the addition of pumpkin flour. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 12, 20-24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.09.001>
- Edwards, E. M., Jones, A. R., & Waites, G. M. H. (1975). The entry of α -chlorohydrin into body fluids of male rats and its effect upon the incorporation of glycerol into lipids. *Reproduction*, 43(2), 225-232.
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2016. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal* 14, e04426.
- El Ramy, R., Elhkim, M. O., Poul, M., Forest, M. G., Leduque, P., & Le Magueresse-Battistoni, B. (2006). Lack of effect on rat testicular organogenesis after in utero exposure to 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD). *Reproductive Toxicology*, 22(3), 485-492.
- Ergönül, P. G., Göldeli, T. (2013). Gıdalarda 3-Monokloropropan-1,2-Diol (3-MCPD) ve Esterlerinin Varlığı, Oluşum Mekanizmaları ve Tespit Yöntemleri. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 11(2), 102-109.
- Ermacora, A. and Hrnčirik, K. (2012). Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89:211–217.
- Ertugay, M. F., & Baslar, M. (2011). Gıdaların Kalite Özelliklerinin Belirlenmesinde Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi. *Gıda/The Journal Of Food*, 36(1).
- European Commission (2011). Opinion of the Scientific Committee on Food on 3-Monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) Updating the SCF Opinion of 1994, 2001.308 R. Weißhaar *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113, 304–308
- FAO, WHO (2007) Discussion paper on chloropropanols derived from the manufacture of acid-HVP and the heat processing of food. In: Proc 1st Session of Codex Committee
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O., Skytt Andersen, P., & Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and experimental immunology*, 147, 227-235. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x
- Ford, W. C. L., and Waites, G.M. H., (1982), Activities of various 6-chloro-6-deoxysugars and (S)-chlorohydrin in producing spermatocoeles in rats and paralysis in mice and in inhibiting glucose metabolism in bull spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65, 177-183.
- Franke, K., Strijowski, U., Fleck, G., Pudiel, F., (2009). Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloropropane-1,2-diol contents in palm oil and rapeseed oil. *LWT--Food Sci. Technol.* 42, 1751–1754.

- Friederich, M., Theurer, C., & Schiebel-Schlosser, G. (2000). Prosta Fink Forte® in the therapy of benign prostatic hyperplasia. Multicentric surveillance study in 2,245 patients. *Forschende Komplementärmedizin und klassische Naturheilkunde = Research in complementary and natural classical medicine*, 7, 200-204.
- Gondim, C. S.; Junqueira, R. G.; Souza, S. V. C., Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis, *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 70, 433-447, **2011**.
- Gonzalez, P., Racamonde, I., Carro Rosa, A. M. and Lorenzo, A. (2011). Combined solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry used for determination of chloropropanols in water. *J. Sep. Sci.* 34:2697–2704.
- González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M. C., Sánchez-Siles, L. M., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2011). Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3624-3631. doi:10.1021/jf1044102
- Gossell-Williams, M., Davis, A., & O'Connor, N. (2006). Inhibition of Testosterone-Induced Hyperplasia of the Prostate of Sprague-Dawley Rats by Pumpkin Seed Oil. *Journal of medicinal food*, 9, 284-286. doi:10.1089/jmf.2006.9.284
- Habermeyer, M., Guth, S., & Eisenbrand, G. (2011). Identification of gaps in knowledge concerning toxicology of 3-MCPD and glycidol esters. *European journal of lipid science and technology*, 113(3), 314-318.
- Haines, T., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P. And Collison, M. W. (2011). Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOFMS. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88:1–14.
- Hamlet, C. G. and Sutton, P. G. (1997). Determination of the Chloropropanols, 3-Chloro-1,2-propanediol and 2-Chloro-1,3-propanediol, in Hydrolysed Vegetable Proteins and Seasonings by Gas Chromatography/Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Rap. Comm. Mass Sp.* 11:1417–1424.
- Hamlet, C. G., Jayaratne, S. M., & Matthews, W. (2002). 3-Monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in food ingredients from UK food producers and ingredient suppliers. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), 15-21.
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A. and Gray, D. A. (2004a). Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 1. Leavened doughs. *J Agr. Food Chem.* 52:2059–2066.
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A. and Gray, D. A. (2004b). Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 2. Unleavened doughs. *J Agr. Food Chem.* 52:2067–2072.
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A., & Gray, D. A. (2003). Influence of composition, moisture, pH and temperature on the formation and decay kinetics of monochloropropanediols in wheat flour dough. *European Food Research and Technology*, 216(2), 122-128.
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A., Crews, C., Velíšek, J., & Baxter, D. E. (2002). Occurrence of 3-chloro-propane-1, 2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Additives & Contaminants*, 19(7), 619-631.
- Hang, L., Joshipura, K., Jiang, R., Hu, F., Hunter, D., Smith-Warner, S., . . . Willett, W. (2004). Fruit and Vegetable Intake and Risk of Major Chronic Disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 1577-1584. doi:10.1093/jnci/djh296

- Hong, H., Kim, C.-S., & Maeng, S. (2009). Effects of pumpkin seed oil and saw palmetto oil in Korean men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Nutrition research and practice*, 3, 323-327. doi:10.4162/nrp.2009.3.4.323
- Hrncirik, K., Zelinkova, Z. and Ermacora, A. (2011). Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:361–367.
- Huang, M. J., Jiang, G. B. and He, B. (2005). Determination of 3-chloropropane- 1,2-diol in liquid hydrolyzed vegetable proteins and soy sauce by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci.* 21:1343–1347.
- IARC. 2012. 3-Monochloro-1,2-propanediol. In: International Agency for Research on Cancer Monographs on Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water, Volume 101, Lyon, France, 349-374.
- IUPAC. (1992). Standard Methods For The Analysis of Oils, Fats and Derivatives (7th Ed.). In In Paquot C, Hautfenne A (Eds.), International Union of Pure and Applied Chemistry, . Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications Inc.
- Jayoung, J., Beom, S. H., Wan-Seob, C., Mina, C., Chang-Su, H., Byoung- Seok, L., Yong-Bum, K., Woo-Chan, S. and Choong-Yong, K. (2010). Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) administered by drinking water to B6C3F1 mice showed no carcinogenic potential. *Arch Toxicol.* 84:719–729.
- JECFA (2002). 3-Chloro-1,2 propanediol. In: WHO Food Add. Ser. 48:401– 432.
- JECFA (2007). 3-Chloro-1,2-propanediol (addendum). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) in Geneva. In : WHO Food Addit. Ser. 58:239–267.
- JECFA. 2016. Evaluation of Certain Contaminants in Food: Eighty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives, Rome. URL:<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254893/9789241210027-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jedrkieicz, R., Kupka, M., Głowacz, A., Gromadzka, J., & Namieśnik, J. (2016). 3-MCPD: A worldwide problem of food chemistry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(14), 2268-2277.
- Jones, A. R. (1978). The antifertility actions of alpha-chlorohydrin in the male. *Life Sci.* 23:1625–1646.
- Jones, A. R. (1983). Antifertility actions of alpha-chlorohydrin in the male. *Aust. J. Biol. Sci.* 36:333–350.
- Jones, A. R., Milton, D. H. and Murcott, C. (1978). The oxidative metabolism of alpha-chlorohydrin in the male rat and the formation of spermatocoele. *Xenobiotica* 8:573–582.
- Jones, A.R., and Ford, S. A., (1984), The action of (S)- α -chlorohydrin and 3-chloro-6-deoxyglucose on the metabolism of guinea pig spermatozoa. *Contraception*, 30, 261-269.
- Jurgita, K., Jariene, E., Danilcenko, H., Kita, A., & Venskutoniene, E. (2007). Oil pumpkins seeds and their quality. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 349-352.

- Kamm, W., Dionisi, F., Fay, L.-B., Hischenhuber, C., Schmarr, H.-G., & Engel, K.-H. (2002). Rapid and simultaneous analysis of 16-O-methylcafestol and sterols as markers for assessment of green coffee bean authenticity by on-line LC-GC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(11), 1109-1113. doi:10.1007/s11746-002-0612-5
- Karasek, L., Wenzl, T., & Ulberth, F. (2010). Proficiency test on the determination of 3-MCPD esters in edible oil. *Luxembourg: Publications Office of the European Union*.
- Karasek, L., Wenzl, T., & Ulberth, F. (2011). Determination of 3-MCPD esters in edible oil—methods of analysis and comparability of results. *European journal of lipid science and technology*, 113(12), 1433-1442.
- Karsulinova, L., Folprechtova, B., Dolezal, M., Dostalova, J., Velisek, J., (2007). Analysis of the lipid fractions of coffee creamers, cream aerosols and bouillon cubes for their health risk associated constituents. *Czech. J. Food Sci.*, 25, 257–264.
- Kaze, N., Sato, H., Yamamoto, H. and Watanabe, Y. (2011). Bidirectional conversion between 3-monochloro-1,2-propanediol and glycidol in course of the procedure of DGF standard methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88:1143–1151.
- Kemmo, S., Ollilainen, V., Lampi, A.-M., & Piironen, V. (2008). Liquid chromatography mass spectrometry for plant sterol oxide determination in complex mixtures. *European Food Research and Technology*, 226, 1325-1334. doi:10.1007/s00217-007-0661-5
- Kirton, K. T., Ericsson, R. J., Ray, J. A. and Forbes, A. D. (1970). Male antifertility compounds: efficacy of U-5897 in primates (*Macacamulatta*). *J. Reprod. Fertil.* 21:275–278.
- Kubec, R., Velíšek, J., Doležal, M., & Kubelka, V. (1997). Sulfur-containing volatiles arising by thermal degradation of alliin and deoxyalliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3580-3585.
- Kuhlmann, J. (2011). Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Sc.* Determination of total 3- chloropropane-1,2- diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide *ience and Technology*, 113, 335-344.
- Kuntzer, J. and Weißhaar, R. (2006). The smoking process - A potent source of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in meat products. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 102:397–400.
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. and Zechner, R. (2011). Lipolysis – a highly regulated multi – enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 50:14–27.
- Lawson, H. W. (1995). *Food oils and fats: technology, utilization and nutrition*. Springer Science & Business Media.
- Lee, B.Q., Khor, S.M., 2015. 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Soy Sauce: A Review on the Formation, Reduction, and Detection of This Potential Carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 48-66.
- Lestari, B., & Meiyanto, E. (2018). A Review: The Emerging Nutraceutical Potential of Pumpkin Seeds. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9, 92. doi:10.14499/indonesianjcanchemoprev9iss2pp92-101
- Lin, Y., Knol, D., Valk, I., van An del, V., Friedrichs, S., Lütjohann, D., . . . Trautwein, E. A. (2017). Thermal stability of plant sterols and formation of their oxidation products

- in vegetable oils and margarines upon controlled heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 99-107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.01.007>
- Maierhans, D. C, Bruehlmann, S., Meili, J. and Taeschler, C. (1998). Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1,2-diol and 2-chloropropane- 1,3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 802:325–333.
- Massey R (2007) Fight against 3-MCPD. *Food Manufact* 82:35–36
- Massey R, Hamlet C (2007) Chloropropanol contaminants in food: the story continues. *Food Sci Tech* 21(4):32–34
- Maw-Rong, L., Tzu-Chun, C. and Jianpeng, D. (2007). Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propandiol in soy sauce by headspace derivatization solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 591:167–172.
- Medjakovic, S., Hobiger, S., Ardjomand-Woelkart, K., Bucar, F., & Jungbauer, A. (2016). Pumpkin seed extract: Cell growth inhibition of hyperplastic and cancer cells, independent of steroid hormone receptors. *Fitoterapia*, 110, 150-156. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.03.010>
- Montesano, D., Blasi, F., Simonetti, M., Santini, A., & Cossignani, L. (2018). Chemical and Nutritional Characterization of Seed Oil from *Cucurbita maxima* L. (var. Berrettina) Pumpkin. *Foods*, 7, 30. doi:10.3390/foods7030030
- Morris, I. D. and Williams, L. M. (1980). Some preliminary observations of the nephrotoxicity of the male antifertility drug (1-)-alpha-chlorohydrin. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:35–38.
- Murkovic, M., Piironen, V., Lampi, A. M., Kraushofer, T., & Sontag, G. (2004). Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chemistry*, 84(3), 359-365. doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00240-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00240-1)
- Mutlu, A. C.; Boyaci, I. H.; Genis, H. E.; Ozturk, R.; Basaran-Akgul, N.; Sanal, T.; Evlice, A. K., Prediction of wheat quality parameters using nearinfrared spectroscopy and artificial neural networks, *European Food Research and Technology*, 233, 267-274, **2011**.
- Nawirska-Olszańska, A., Kita, A., Biesiada, A., Sokół-Łętowska, A., & Kucharska, A. (2013). Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chemistry*, 139, 155-161. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.009
- Neđeral, S., Škevin, D., Kraljić, K., Obranovic, M., Papeša, S., & Bataljaku, A. (2012). Chemical Composition and Oxidative Stability of Roasted and Cold Pressed Pumpkin Seed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89. doi:10.1007/s11746-012-2076-0
- Newgard E.C. (2004). Near-Infrared Spectroscopy for Analysis of Agricultural Material. Final Reports for Physics Optical Spectroscopy 1-11.
- Ni YN, Zhang GW, Kokot S. 2005. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks. *Food Chem* 89 (3): 465-473.

- Nicolaï, B. M.; Beullens, K.; Bobelyn, E.; Peirs, A.; Saeys, W.; Theron, K. I.; Lammertyn, J., Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review, *Postharvest Biology and Technology*, 46, 99-118, 2007.
- Nunes, C. A., Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats, *Food Research International*, 60, 255-261, **2014**.
- O'Callaghan, Y., McCarthy, F. O., & O'Brien, N. M. (2014). Recent advances in Phytosterol Oxidation Products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 786-791. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.148>
- Ogrodowska, D., Tanska, M., & Brandt, W. (2017). The Influence of Drying Process Conditions on the Physical Properties, Bioactive Compounds and Stability of Encapsulated Pumpkin Seed Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 10(7), 1265-1280. doi:10.1007/s11947-017-1898-z
- Osborne, B. G. (2006). Near-infrared spectroscopy in food analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. (eds: R. A. Meyers, R. J. M.)
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.T. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis* (2nd ed.). Singapore: Longman Scientific and Technical.
- Parry, J. W., Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. L. (2008). Fatty Acid Composition, Antioxidant Properties, and Antiproliferative Capacity of Selected Cold-Pressed Seed Flours. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(5), 457-464. doi:10.1007/s11746-008-1207-0
- Pasquini, C. (2003). Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of Brazil Chemistry Society*, 14(2), 198-219.
- Patel, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seeds as nutraceutic: a review on status quo and scopes. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6(3), 183-189. doi:10.1007/s12349-013-0131-5
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., & Geromichalos, G. (2014). Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *Molecules* (Basel, Switzerland), 19, 9655-9674. doi:10.3390/molecules19079655
- Porter, K. E., and Jones, A. R., 1982, The effect of the isomers of chlorohydrin and racemic chlorolactate on the rat kidney. *Chemico-Biological Interactions*, 41, 95-104.
- Potočnik, T., Rak Cizej, M., & Košir, I. J. (2018). Influence of seed roasting on pumpkin seed oil tocopherols, phenolics and antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 7-12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.020>
- Puzarro, C.; Esteban-Díez, I.; Nustal, A.-J.; Gonzalez-Saiz, J.-M. a., Influence of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 509, 217-227, **2004**.
- Rabrenović, B. B., Dimić, E. B., Novaković, M. M., Tešević, V. V., & Basić, Z. N. (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 521-527. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.019>

- Rabrenovic, B. B., Vujasinovic, V. B., Novakovic, M. M., Corbo, S. C., & Basic, Z. N. (2016). Comparative Review of the Nutritional Value of Cold-Pressed Pumpkin (*Cucurbita Pepo* L.) Seed Oil of Different Origins. *Hemijaska Industrija*, 70(1), 59-65. doi:10.2298/hemind141128011r
- Racamonde, I., Gonzalez, P., Lorenzo, R. A. and Carro, A. M. (2011). Determination of chloropropanols in foods by one-step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218:6878– 6883.
- Raczyk, M., Siger, A., Radziejewska-Kubzdela, E., Ratusz, K., & Rudzińska, M. (2017). Roasting pumpkin seeds and changes in the composition and oxidative stability of cold-pressed oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16, 293-301. doi:10.17306/j.afs.0494
- Rahn, A. K. K. and Yaylayan, V. A. (2011). What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:323–329.
- Ratnam, N., Vandana, Najibullah, & Ibrahim. (2017). A Review on *Cucurbita pepo*. *Phytopathology*, 9.
- Razak, R.A.A., Kuntom, A., Siew, W.L., Ibrahim, N.A., Ramli, M.R., Hussein, R., Nesaretnam, K. (2012). Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils. *Food Control*, 25, 355-360.
- Reece, P., Crews, C., Hasnip, S., Hamlet, C. G., Sadd, P., Baxter, D., & Dolezal, M. (2005). The origin and formation of 3-MCPD in foods and food ingredients. FSA Project C, 3017, 18.
- Reinholds, I.; Bartkevics, V.; Silvis, I. C. J.; van Ruth, S. M.; Esslinger, S., Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review, *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 56-72, **2015**.
- Retho, C. and Blanchard, F. (2005). Determination of 3-chloropropane-1,2-diol as its 1,3-dioxolane derivative at the mg/kg-1 level: application to a wide range of foods. *Food Addit. Contam.* 22:1189–1197.
- Rinnan, A.; Berg, F. v. d.; Engelsen, S. B., Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 1201-1222, **2009**.
- Riovento, R., Marchi, M. D., Cassandro, M., Penasa, M. (2012). Use of near infrared transmittance spectroscopy to predict fatty acid composition of chicken meat. *Food Chemistry*, 134(4), 2459-2464.
- Ripoll, G.; Lobon, S.; Joy, M., Use of visible and near infrared reflectance spectra to predict lipid peroxidation of light lamb meat and discriminate dam's feeding systems, *Meat Science*, 143, 24-29, **2018**.
- Robert, M. C., Oberson, J. M., & Stadler, R. H. (2004). Model studies on the formation of monochloropropanediols in the presence of lipase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 5102-5108.
- Roberts, J. J.; Cozzolino, D., An Overview on the Application of Chemometrics in Food Science and Technology—An Approach to Quantitative Data Analysis, *Food Analytical Methods*, 9, 3258-3267, **2016**.

- Rodionova, O. Y.; Titova, A. V.; Pomerantsev, A. L., Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 17-22, **2016**.
- Savitzky, A.; Golay, M. J. E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, *Analytical Chemistry*, 36, 1627- 1639, **1964**.
- Schilter, B., Scholz, G., & Seefelder, W. (2011). Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects. *European journal of lipid science and technology*, 113(3), 309-313.
- Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G. et al., (2008). Esters of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD. *Food Addit. Contam.* 25, 391–400.
- Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., & Matthäus, B. (2013). Influence of chloride and glycidyl-ester on the generation of 3-MCPD-and glycidyl-esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(7), 735-739.
- Siegmund, B., & Murkovic, M. (2004). Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 2: volatile compounds). *Food Chemistry*, 84(3), 367-374. doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00241-3)
- Sierra, V., Aldai, N., Castro, P., Osoro, K., Montes, A.C., Olivan, M. (2008). Prediction of the fatty acid composition of beef by near infrared spectroscopy. *Meat Science*, 78(3), 248-255.
- Siesler, H. W.; Ozaki, Y.; Kawata, S.; Heise, H. M., *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. Wiley;2008.
- Šilhánková, L., Šmíd, F., Černá, M., Davídek, J., & Velíšek, J. (1982). Mutagenicity of glycerol chlorohydrines and of their esters with higher fatty acids present in protein hydrolysates. *Mutation Research Letters*, 103(1), 77-81.
- Sinelli, N., Casale, M., Egidio, V.D., Oliveri, P., Bassi, D., Tura, D., Casiraghi, E. (2010). Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. *Food Research International*, 43(8), 2126-2131.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86. doi:10.1021/jf010865b
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/ajev/16/3/144.full.pdf>
- Stadler, R. H., & Lineback, D. R. (Eds.). (2008). Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks. John Wiley & Sons.
- Stadler, R. H., Theurillat, V., Studer, A., Scanlan, F., & Seefelder, W. (2007). The formation of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in food and potential measures of control. *Thermal Processing of Food: Potential Health Benefits and Risks*, 141-154.
- Tadmor, Y., Paris, H., Meir, A., Schaffer, A., & Lewinsohn, E. (2006). Dual Role of the Pigmentation Gene B in Affecting Carotenoid and Vitamin E Content in Squash (

- Cucurbita pepo) Mesocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9759-9763. doi:10.1021/jf0520591
- Tekin, Z. H., & Karasu, S. (2020). Cold-pressed flaxseed oil by-product as a new source of fat replacers in low-fat salad dressing formulation: Steady, dynamic and 3-ITT rheological properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14650.
- Tekin-Cakmak, Z. H., Karasu, S., Kayacan-Cakmakoglu, S., & Akman, P. K. (2021). Investigation of potential use of by-products from cold-press industry as natural fat replacers and functional ingredients in a low-fat salad dressing. *Journal of Food Processing and Preservation*, e15388.
- Twomey, M., Downey, G., McNulty, P.B. (1995). The potential of NIR spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(1), 77-84.
- Van Duuren, B. L., Goldschmidt, B. M., Katz, C., Seidman, J. and Paul, J. S. (1974). Carcinogenic activity of alkylating agents. *J. Natl Cancer Inst.* 53:695–700.
- Velisek J, Davidek J, Hajslova J, Kubelka V, Janicek G, Mankova B (1978) Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Z Lebensm Unters Forsch* 167(4):241–244
- Velisek, J., Davidek, J., Kubelka, V., Janicek, G., Svobodova, Z., & Simicova, Z. (1980). New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1142-1144.
- Velisek, J., Davidek, T., Davidek, J., Kubelka, V., & Viden, I. (1991). 3-Chloro-1, 2-propanediol derived amino acids in protein hydrolysates. *Journal of food science*, 56(1), 139-142.
- Vujasinovic, V., Djilas, S., Dimic, E., Basic, Z., & Radocaj, O. (2012). The effect of roasting on the chemical composition and oxidative stability of pumpkin oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(5), 568-574. doi:https://doi.org/10.1002/ejlt.201100158
- Wan, H., Liu, R., Sun, H., Yu, X., Li, Y., Cong, Y., & Liu, D. (2014). Caco-2 cell-based Antioxidant Activity of 36 Vegetables Commonly Consumed in China. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2, 88-95. doi:10.12691/jfnr-2-2-5
- Weisshaar, R. (2011). Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:304–308.
- Weisshaar, R., (2008). Determination of total 3-chloropropane-1,2- diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 183–186.
- Westerhuis, J. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Smit, S.; Vis, D. J.; Smilde, A. K.; van Velzen, E. J. J.; van Duijnhoven, J. P. M.; van Dorsten, F. A., Assessment of PLS-DA cross validation, *Metabolomics*, 4, 81-89, **2008**.
- Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109-130, **2001**.
- Wong, K.O., Cheong, Y.H., Seah, H.L. (2006). 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in soy and oyster sauces: Occurrence and dietary intake assessment. *Food Control*, 17, 408-413.
- Xie, L.J., Ye, X.Q., Liu, D.H., Ying, Y.B. (2008). Application of principal component radial basis function neural networks (PC-RBFNN) for the detection of water

- adulterated bayberry juice by near-infrared spectroscopy. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(12), 982-989.
- Xing, H. Z., Fang, B., Pang, G. F., & Ren, F. Z. (2019). 3-Monochloropropane-1, 2-diol causes irreversible damage to reproductive ability independent of hormone changes in adult male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 10-16.
- Xu, X., Ren, Y., Wu, P., Han, J. and Shen, X. (2006). The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavoring with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionization modes. *Food Addit. Contam.* 23:110–119.
- Zeaiter, M.; Roger, J. M.; Bellon-Maurel, V., Robustness of models developed by multivariate calibration. Part II: The influence of preprocessing methods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 437-445, **2005**.
- Zelinkova, Z., Dolezal, M., Velisek, J., (2009a). 3-Chloropropane- 1,2-diol fatty acid esters in potato products. *Czech. J. Food Sci.*27, 421–424.
- Zelinkova, Z., Dolezal, M., Velisek, J., (2009b). Occurrence of 3- chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 571–578.
- Zelinkova, Z., Novotny, O., Schurek, J., Velisek, J. et al.(2008). Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. *Food Addit. Contam.* 25, 669–676.
- Zelinkova, Z., Svejkovska, B., Velisek, J., Dolezal, M.,(2006) Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Addit. Contam.* 23, 1290–1298.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

1. Uluslararası Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Basdogan, H., Karası, S., Metin, R., “ Detecting Of 3-MCPD İn Edible Oil By Near Infrared Spectroscopy (NIR), ” International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AgroFood), 2019

2. Uluslararası Bilimsel Dergilerde Yayınlanan Makaleller

Basdogan, Hakan; Akman, Perihan; Metin-Yildirim, Rusen; sağdıç, osman; Gecgel, U Tekin-Cakmak, Zeynep; karasu, Salih., “The Effect Of Press Temperature On The Tocopherols, Sterol, Fatty Acid, Phenolic Profile, In-Vitro Cytotoxicity Assay, And Inflammatory Activity”, Food Science and Technology, 2021