

**FINDIĞIN KAVRULMASI SIRASINDA
GERÇEKLEŞEN MAILLARD REAKSİYONUNA
LİPİT OKSİDASYONUNUN KATKISI**

**CONTRIBUTION OF LIPID OXIDATION
TO MAILLARD REACTION DURING
ROASTING OF HAZELNUTS**

YEŞİM KARADEMİR

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

FINDIĞIN KAVRULMASI SIRASINDA GERÇEKLEŞEN MAILLARD REAKSİYONUNA LİPİT OKSİDASYONUNUN KATKISI

Yeşim Karademir

ÖZ

Bu çalışmada fındığın kavrulması sırasında gerçekleşen lipit oksidasyonunun Maillard reaksiyonuna katkısı araştırılmıştır. Kavrulmuş fındıktaki olası lipit oksidasyonu ve enzimatik olmayan esmerleşme (E.O.E.) reaksiyonu ürünlerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle fındık yağı ve farklı amino asitlerden oluşan model sistemler üzerinde çalışılmıştır. 180 °C'de ısıtılan fındık yağı ve model sistemlerde belirlenen lipit oksidasyonu ürünleri, E.O.E. reaksiyonu ürünleri ve amino asit miktarında meydana gelen değişim izlenmiştir. Karbonil grubuna sahip ve baskın miktarda oluşan lipit oksidasyonu ürünleri 2,4-dekadienal, 4-hidroksi-2-nonenal, nonandioik asit ve oktandioik asit olarak belirlenmiştir. Model sistem çalışmaları sonucunda 4-hidroksi-2-nonenal, 2,4-dekadienal ve 2,4-dekadienale ait Schiff bazı, dekarboksile formu, Schiff bazı veya dekarboksile formun hidrolitik parçalanmasıyla oluşan reaksiyon ürünleri tespit edilmiştir. Fındığın kavrulması sırasında serbest amino asit ve şeker miktarında meydana gelen değişim, HMF ve furosin oluşumu incelenmiştir. 160 °C'de 30 dakika kavurma işlemi sonucunda toplam serbest amino asit miktarında önemli ölçüde azalma ve HMF (8,7 μ g⁻¹) oluşumu gözlenirken furosin oluşumuna rastlanmamıştır. Maillard reaksiyonu markörü olarak bilinen furosinin fındığın kavrulması sırasında gerçekleşen E.O.E. reaksiyonlarının değerlendirilmesi için uygun bir markör olmadığı gösterilmiştir. Herhangi bir amino asit ya da lipit oksidasyon ürününe özgü olmayan reaksiyon ürünlerinin fındığın kavrulması sırasında gerçekleşen esmerleşme reaksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılma potansiyelinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lipit oksidasyonu, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu, fındık

Danışman: Prof. Dr. Vural Gökmen, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

CONTRIBUTION OF LIPID OXIDATION TO MAILLARD REACTION DURING ROASTING OF HAZELNUTS

Yeşim Karademir

ABSTRACT

In this study, the contribution of lipid oxidation to non enzymatic browning reactions in roasted hazelnuts was investigated. In order to determination of possible lipid oxidation and non enzymatic browning reaction products in roasted hazelnut, hazelnut oil and model systems consisting of different amino acids were used. Changes in determined lipid oxidation, non enzymatic browning reaction products and amino acid content was monitored in hazelnut oil and model systems. 2,4-decadienal, 4-hydroxy-2-nonenal, nonanedioic acid and octanedioic acid were determined as dominant lipid oxidation products having carbonyl groups. As the conclusion of model system studies 4-hydroxy-2-nonenal, 2,4 decadienal, Schiff base, decarboxylated form and reaction products formed after hydrolytic cleavage of Schiff base or decarboxylated form were identified. During the roasting of hazelnut, free amino acid and sugar content, HMF and furosine formation were analyzed. After roasting process at 160 °C for 30 min. although the significant decrease in total free amino acid content and HMF (8,7 µg g⁻¹) formation were observed, no furosine was detected. This result indicated that furosine which known as a marker of early stages of Maillard reaction is not suitable for evaluation of non enzymatic browning reactions during roasting of hazelnut. As a consequence it is proposed that stabile cleavage products which are not specific to any amino acid either lipid oxidation products have potential to be used for evaluation of non enzymatic browning reactions during roasting of hazelnut.

Key Words: non enzymatic browning, lipid oxidation, hazelnut

Advisor: Prof. Dr. Vural Gökmen, Hacettepe University, Department of Food Engineering

TEŞEKKÜR

Değerli görüş ve önerileriyle tez çalışmamın her aşamasındaki katkılarından dolayı hocam sayın Prof. Dr. Vural Gökmen'e,

Deneysel çalışmaların yürütülmesinde ve diğer aşamalarda yardımlarını esirgemeyen başta Neslihan Göncüoğlu, Tolgahan Kocadağlı, Burçe Ataç Mogol olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım ve sayın uzman Yelda Zencir'e,

Eğitim ve öğrenim hayatım boyunca gelişmemde önemli katkı ve destekleri olan tüm hocalarıma,

Lisans öğrenimim boyunca her konuda desteklerini gördüğüm, hayatımda ayrı bir önemi olan dedem merhum Necmettin Karademir ve babaannem Muzaffer Karademir'e,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da bana her konuda yardımcı olan, ilgi ve desteklerini gösteren babam Temel Karademir, annem Niğmet Karademir ve kardeşim Gökhan Karademir'e

teşekkürlerimi sunarım.

Yeşim Karademir

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lipit Oksidasyonu	3
2.1.1. Lipit oksidasyonu ve gıdalardaki önemi	3
2.1.2. Otooksidasyon aşamaları	5
2.3. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları	20
2.3.1. Maillard reaksiyonu	20
2.3.2. Lipit oksidasyonu ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu	24
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Kimyasallar ve Malzemeler	29
3.2. Fındık Yağının Termal Oksidasyonu	30
3.3. Model Sistemlerin Hazırlanması	30
3.4. Kavrulmuş Fındık Örneklerinin Hazırlanması	30
3.5. Lipit Oksidasyon Ürünlerinin Analizi	31
3.6. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonu Ürünlerinin Analizi	31
3.6.1. Model reaksiyon sistemlerinde reaksiyon ürünlerinin ekstraksiyonu	32
3.6.2. Fındıkta reaksiyon ürünlerinin ekstraksiyonu	32
3.6.3. LC-HRMS analizi	32
3.7. Serbest Amino Asit Analizi	33
3.8. Furosin Analizi	34
3.9. HMF Analizi	34
3.10. Şeker Analizi	34
3.11. İstatiksel Analizler	34

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Fındık Yağının Isıtılması ile Lipit Oksidasyon Ürünlerinin Oluşumu	37
4.2. Model Sistemlerin Isıtılması Sırasında Meydana Gelen Kimyasal Değişmeler	41
4.3. Fındığın Kavrulması Sırasında Meydana Gelen Kimyasal Değişmeler	51
5. ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

INC	Uluslararası sert kabuklu ve kuru meyve konseyi (International Nut and Dried Fruit Council)
E.O.E.	Enzimatik olmayan esmerleşme
HMF	5-Hidroksimetilfurfural
k	Reaksiyon hız sabiti
T	Sıcaklık
Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
Cys	Sistein
Glu	Glutamik asit
Gln	Glutamin
Gly	Glisin
His	Histidin
Ile	İzolösin
Leu	Lösin
Lys	Lisin
Met	Metionin
Phe	Fenilalanin
Pro	Prolin

Ser	Serin
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
Val	Valin
The	Teanin
U-HPLC	Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
MS	Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry)
ESI	Elektrosprey İyonizasyon (Electrospray Ionization)
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
DAD	Diyot Dizini Dedektör (Diode Array Detector)
V	Titrant hacmi
m	Örnek ağırlığı
F	Azot faktörü
RID	Refraktif İndeks Dedektör (Refractive Index Detector)
2,4-Dek	2,4-dekadienal
2,4-Dek SB	2,4-dekadienalin herhangi bir amino asitle oluşturduğu Schiff bazı
DF	2,4-dekadienalin Schiff bazının dekarboksile formu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Lipit oksidasyonu aşamaları	4
Şekil 2.2. Oksijen ve çift bağı triplet ve singlet durumları	6
Şekil 2.3. Oksijenin çift bağına eklenmesi	7
Şekil 2.4. Oleik asidin otooksidasyonu ve primer oksidasyon ürünleri.....	8
Şekil 2.5. Linoleik asidin otooksidasyonu ve primer oksidasyon ürünleri.....	9
Şekil 2.6. Linolenik asit peroksil radikallerinin siklizasyonu	10
Şekil 2.7. Hidroperoksi epidioksit ve epidioksi-hidroperoksit oluşumu.....	11
Şekil 2.8. Peroksil radikallerinin çift bağına eklenmesi	12
Şekil 2.9. Peroksil radikallerinin rekombinasyonu ve disproporsiyonu.....	13
Şekil 2.10. Alkoksil radikalleri tarafından lipit zincirinden H transferi	14
Şekil 2.11. Alkoksil radikalleri tarafından hidroperoksitlerden H transferi	15
Şekil 2.12. Alkoksil radikallerinin siklizasyonu	15
Şekil 2.13. Alkoksil radikallerinin çift bağına eklenmesi.....	16
Şekil 2.14. Alkoksil radikallerinin β -ayırılma tepkimesi	16
Şekil 2.15. Peroksitlerin dekompozisyonu	17
Şekil 2.16. Peroksil radikallerinden radikal ve radikal olmayan ürünlerin oluşumu.....	18
Şekil 2.17. Alkoksil ve alkil radikallerinin rekombinasyonu	19
Şekil 2.18. Maillard reaksiyonunun farklı bölümleri.....	21
Şekil 2.19. Amadori bileşiği oluşumu	21
Şekil 2.20. Amadori bileşiğinin enolizasyonu.....	22
Şekil 2.21. 3-Deoksiozon oluşumu	22
Şekil 2.21. 5-Hidroksimetilfurfural oluşumu	23
Şekil 2.23. Lipit oksidasyon ürünü ve amino asitlerin reaksiyonu	26
Şekil 2.24. Aldol kondensasyonu ile kahverengi pigmentlerin oluşumu.....	26
Şekil 2.25. N-sübstitüe hidroksialkilpirollerin oluşumu ve polimerizasyonu	28
Şekil 4.1. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan 2,4 dekadial kromatogramı	37
Şekil 4.2. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan 4-Hidroksi-2-nonenal kromatogramı	38
Şekil 4.3. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan nonandioik asit kromatogramı	38

Şekil 4.4. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan oktandioik asit kromatogramı	38
Şekil 4.5. Linoleik asidin oksidasyonu sırasında 2,4 dekadienal oluşumu	39
Şekil 4.6. Linoleik asidin oksidasyonu sırasında 4-Hidroksiperoкси-2-nonenal oluşumu	40
Şekil 4.7. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve fındık yağında oluşan 2,4 dekadienal miktarı.....	41
Şekil 4.8. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistemde oluşan 2,4 dekadienal ve Schiff bazı miktarı.....	42
Şekil 4.9. 2,4 dekadienalin lisinle reaksiyonu sonucu Schiff bazı ve dekarboksile formunun oluşumu	43
Şekil 4.10. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve fındık yağında oluşan 4-Hidroksi-2-nonenal miktarı	43
Şekil 4.11. 4-Hidroksi-2-nenenalin lisinle reaksiyonu sonucu Schiff bazı oluşumu	44
Şekil 4.12. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve sadece lisin içeren sistemde, lisin miktarında meydana gelen değişim	44
Şekil 4.13. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı ve lösin içeren sistemde, 2,4-dekadienal (2,4 Dek), Schiff bazı (2,4-Dek SB) ve dekarboksile formunun (DF) oluşumu	45
Şekil 4.14. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı ve lösin ya da lösin içeren sistemlerde, 2,4 dekadienal oluşumu	46
Şekil 4.15. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı-lisin ya da lösin içeren sistemlerde, 2,4 dekadienal Schiff bazı oluşumu	47
Şekil 4.16. 180 °C'de 10 dakika ısıtma sonucu 0,1, 1,5 ya da 2 mL fındık yağı-lisin içeren sistemlerde, 2,4 dekadienal ve Schiff bazı oluşumu	48
Şekil 4.17. 2,4 dekadienal-lisin genel reaksiyon şeması	49
Şekil 4.18. Fındık yağı ve lisin içeren model sistemlerin 180 °C'de 10 dakika ısıtılması sonucu belirlenen Şekil 4.17.'deki bileşiklere ait kromatogramlar.....	50
Şekil 4.19. Fındığın 160 °C'de 30 ve 60 dakika kavrulması sonucu toplam serbest amino asit miktarında meydana gelen değişim	52
Şekil 4.20. Fındığın 160 °C'de 10, 30 ve 60 dakika kavrulması sonucu glukoz ve fruktoz miktarında meydana gelen değişim	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Açıl zincirinde farklı pozisyonlarda bulunan hidrojenlere ait bağ enerjileri	7
Çizelge 3.1. E.O.E. ürünlerinin analizinde uygulanan elüsyon programı.....	33
Çizelge 4.1. 180 °C'de 10 dakika ısıtma sonucu fındık yağı-lisin/lösin/fenilalanin/serin içeren sistemlerde, 2,4-Dek SB (3) ve DF (4) oluşumu	51

1.GİRİŞ

Fındık birçok farklı ürünün bileşiminde yer almasının yanı sıra Türkiye'nin üretim ve ihracatında lider ülke pozisyonunda olması nedeniyle de gıda sanayi açısından önemli bir gıdadır. INC (Uluslararası sert kabuklu ve kuru meyve konseyi) 2004-2010 verilerine göre Dünya fındık üretiminin yaklaşık % 70' i, ihracatının ise %79' u Türkiye tarafından gerçekleştirilmektedir.

Kavurma işlemi fındığın temel proses basamakları arasında yer almaktadır. Bu işlem ile fındığın flavor, renk ve tekstürü olumlu yönde etkilenirken aynı zamanda fındık zarının uzaklaştırılması, enzim inaktivasyonu, mikroorganizma yıkımı sağlanır. Renk, flavor ve tekstürdeki değişimler fındığın kavrulması sırasında suyun uzaklaşması, lipid oksidasyonu ve E.O.E. reaksiyonları sonucunda meydana gelir (Özdemir et al., 2001).

Lipitlerin E.O.E.'deki rolünü belirlemek üzere birçok çalışma, model sistemler üzerinde gerçekleştirilmiş ve lipitlerin bu reaksiyonlardaki rolünün karbonhidratların Maillard reaksiyonundaki rolüne benzer olduğu görülmüştür (Hidalgo and Zamora, 2000). Maillard reaksiyonunda olduğu gibi okside lipid-protein interaksiyonları da birbiriyle bağlantılı çok sayıda reaksiyonlardan oluşmaktadır (Hui et al., 2006). Farklı yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu çeşitli oksidasyon ürünlerinin oluşumu ve farklı reaktif protein kalıntılarının varlığı kompleks reaksiyonların oluşumunda etkili olmaktadır. Reaktif özellikteki reaksiyon ara ürünleri düşük konsantrasyonlarda bulduklarından ve izolasyon sırasında da reaksiyona girmeye devam ettiklerinden analizleri güçleşmektedir. Bu nedenle yakın zamanda sınırlı sayıda reaksiyon ürünü izole edilebilip, tanımlanabilmiştir (Hidalgo and Zamora, 2000). Okside lipitlerin neden olduğu esmerleşme reaksiyonları sonucunda düşük molekül ağırlığında renkli bileşik ve yüksek molekül ağırlığında polimerlerin oluştuğu öne sürülmektedir fakat bu ürünlerle ilgili henüz kantitatif veri bulunmamaktadır (Hidalgo and Zamora, 2011).

Fındık bileşiminde ortalama % 61,21 yağ, % 17,30 karbonhidrat, % 15,35 protein ve % 3,9 su bulunmaktadır. Fındık yağı bileşimindeki yağ asitlerinin % 75,2 - % 84,2 si oleik asit, % 7,9 - % 18,5 kadarı linoleik asittir. Toplam şeker miktarı kuru

maddede % 2,8 - 7,9 arasındadır. Toplam şekerin yalnızca küçük bir bölümü glukoz ve fruktozdan oluşmaktadır (Alasalvar et al., 2003; Köksal et al., 2005).

Kompozisyonu dikkate alındığında, fındığın lipit oksidasyonu ve E.O.E. reaksiyonları arasındaki ilişkinin gıda sistemlerinde araştırılması için uygun bir materyal olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada fındığın kavrulması sırasında gerçekleşen lipit oksidasyonunun Maillard reaksiyonuna katkısı araştırılmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle fındık yağının ısıtılması ile oluşan ve karbonil grubuna sahip baskın oksidasyon ürünleri belirlenmiştir. Daha sonra fındık yağı ve farklı amino asitlerden oluşan model sistemler üzerinde çalışılmıştır. Model sistemlerin ısıtılması sırasında amino asit ve daha önce belirlenen lipit oksidasyon ürünleri bunların miktarları arasındaki değişim ve reaksiyon ürünleri incelenmiştir. Son olarak fındığın kavrulması sırasında meydana gelen amino asit, şeker miktarındaki değişim ile 5-hidroksimetilfurfural (HMF), furosin oluşumu izlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipit Oksidasyonu

2.1.1. Lipit oksidasyonu ve gıdalardaki önemi

Gerek gıda üzerindeki etkileri gerekse karmaşık reaksiyon yapısı düşünüldüğünde lipit oksidasyonu, gıda bilimi açısından önemli reaksiyonlar arasında yer almaktadır. Hoş olmayan koku, flavor ve tat oluşumu ile gıda kalitesi, toksik reaksiyon ürünlerinin oluşumu ile gıda güvenliği olumsuz yönde etkilenmektedir (Frankel, 1980). Oksidasyon sonucu, ransit tat ve kokunun oluşması gıda tüketilebilirliğini olumsuz etkilerken olgunlaştırılmış peynir ve kızartılmış gıdalarda olduğu gibi bazı durumlarda ise arzu edilen tat ve kokunun oluşması için sınırlı seviyede lipit oksidasyonu istenmektedir (Fennema et al., 1996).

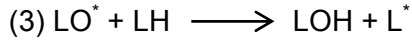
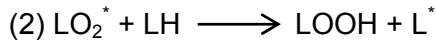
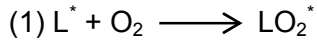
Lipit oksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonudur ve başlangıç, ilerleme, dallanma ve sonlanma olmak üzere 4 aşamadan meydana gelir. Yağ asidinin oksijenle reaksiyona girerek serbest radikal (L^*) oluşturması termodinamik olarak zordur (aktivasyon enerjisi: 35 kcal). Bu nedenle ilk serbest radikal oluşumu için katalizör gereklidir. Serbest radikal oluşumu, metal katalizörler, ışık etkisiyle veya direkt olarak termal ayrılma, hidroperoksit dekompozasyonu sonucu gerçekleşebilir. Reaksiyonda etkili katalizörlere bağlı olarak reaksiyon mekanizmasında değişiklik olmakta ve oksidasyon peroksidasyon, fotooksidasyon gibi farklı isimlerle anılmaktadır (Schaich, 2005; Belitz et al., 2009).

Başlangıç aşamasında, yağ asidi zinciri üzerindeki çift bağa komşu C atomundan H ayrılması ile alkil radikali (L^*) oluşur ve açıkta kalan tek elektron delokalize olarak zincir üzerinde çift bağın yer değiştirmesine neden olur. İlerleme aşamasında, serbest radikal zincirine aynı bölgeden O_2 eklenerek peroksil radikalleri (LOO^*) oluşur. Peroksil radikalleri tarafından yağ asitlerinden ve diğer moleküllerden (LH) H ayrılması ile hidroperoksit ve yeni serbest radikaller oluşur. Oluşan serbest radikaller oksijenle reaksiyona girer. Bu şekilde tekrarlanan reaksiyon serisi, reaksiyonun otokatalitik olarak ilerlemesini sağlar. Oksidasyon reaksiyonlarının yeni bir açıl zincirinden çok aynı molekül üzerinden devam etme eğiliminde olduğunu destekleyen birçok bulgu mevcuttur (Schaich, 2005). Reaksiyon hidrojen kaynağı kalmayınca kadar veya zincir reaksiyonu durduruluncaya kadar devam eder.

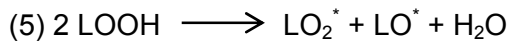
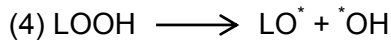
Keşfedilen ilk lipid oksidasyon ürünü olan hidroperoksitler kısmi stabil özellikte olduklarından kompleks reaksiyon serisinin başlamasında etkili olmaktadır. Peroksi ve alkoksi radikallere parçalandıktan sonra aldehit, keton, alkol, asit ve laktonlar gibi sekonder reaksiyon ürünlerini oluştururlar (Benzie, 1996; Lundberg et al., 1947; Schaich, 2005). Sekonder reaksiyon ürünleri gıdalarda bozulmuş tat, flavor ve tekstür, insan vücudunda ise olumsuz etkileri olan reaksiyonlardan sorumludurlar (Eldin et al., 2003).

Sonlanma aşamasında ise parçalanma reaksiyonları sonucu oluşan alkil, alkoksi ve peroksi radikalleri birleşerek daha stabil, dimer ve dimer benzeri ürünleri oluştururlar.

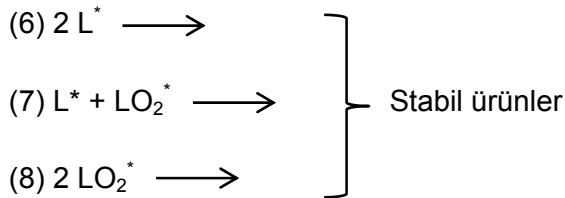
İlerleme



Dallanma



Sonlanma



Şekil 2.1. Lipit oksidasyonu aşamaları (Belitz et al., 2009)

Model sistem çalışmaları, otooksidasyon oranının, yağ asidi kompozisyonu, doymamışlık derecesi, prooksidan ve antioksidan varlığı ve aktivitesi, oksijenin kısmi basıncı, oksijenle temas eden yüzey alanı ve depolama koşullarından (sıcaklık, ışık, nem) etkilendiğini göstermiştir. Bu faktörlerin dışında lipit yapısı ve triaçilgliserol molekülündeki doymamış yağ asidinin pozisyonu da otooksidasyon oranını etkilemektedir. Miyashita and Takagi (1986), serbest oleik, linoleik ve linolenik asidin metil esterlerine kıyasla daha hızlı otooksidasyona uğradığını göstermişler ve serbest yağ asidi üzerindeki karboksil gruplarının hidroperoksitlerin dekompozisyonunda katalitik aktivite göstermesinin bu durumun oluşmasında etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Eldin et al., 2003). Ayrıca triaçilgliserol molekülünde 1 ve 3 pozisyonlarında bulunan doymamış yağ asitleri 2 pozisyonunda yer alanlara göre daha hızlı okside olmaktadır (Belitz et al., 2009).

2.1.2. Otooksidasyon aşamaları

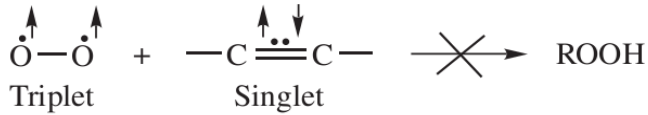
2.1.2.1. Başlangıç

Doymamış yağ asidi oksidasyonu genellikle duraklama fazı veya daha çok indüksiyon periyodu olarak bilinen başlangıç aşaması ile başlar. İndüksiyon periyodunun uzunluğu ve oksijen kullanım oranı; yağ asidi kompozisyonu, ortamdaki prooksidan-antioksidan ve katalizör varlığına bağlıdır. Daha fazla allil grubu varlığında indüksiyon periyodu kısalmakta ve oksidasyon oranı artmaktadır (Belitz et al., 2009).

Zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olan ilk hidroperoksitlerin oluşması ile ilgili mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir. Termodinamik olarak oksijen, spin durumları farklı olduğundan direkt çift bağla reaksiyona giremez. Bir atomdaki elektronların toplam açısal momentumu $2S+1$ ile ifade edilir (S: Toplam spin). Eğer atom oksijen gibi en dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduruyorsa spinlerinin birbirine paralel veya antiparalel konumda olmasına göre iki farklı hal söz konusu olur. Oksijen için bu haller triplet, $3O_2 [2(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}) + 1 = 3]$ ve singlet, $1O_2 [2(\frac{1}{2} - \frac{1}{2}) + 1 = 1]$ olarak adlandırılmıştır. Singlet durumdaki oksijen triplet durumdaki oksijenden daha elektrofildir ve elektron yoğunluğunun fazla olması durumunda triplet oksijene göre 1500 kat hızlı reaksiyon vermektedir. Singlet

oksijenin fotooksidasyonun başlamasında etkili olduğu düşünülmektedir (Fennema et al., 1996).

Temel haldeki oksijen triplet durumda (iki serbest elektron farklı orbitallerde, aynı spin yönünde ve net pozitif açısal momentuma sahip) iken çift bağ, singlet durumda (ortaklanmış elektron çifti yok, ortaklanmış elektronlar aynı orbitalde ve farklı spin yönünde, net açısal momentum yok) bulunur. Kuantum mekaniğine göre reaksiyon sırasında spin açısal momentumunun korunması, çift bağın uyarılarak triplet duruma geçirilmesi gerekir. Bunun için de yüksek miktarda aktivasyon enerjisine ($E_a = 35-65$ kcal/mole) ihtiyaç duyulur (Schaich, 2005). Bu nedenle direkt reaksiyon gerçekleşemez. Reaksiyonu başlatan madde veya katalizör, lipid ya da oksijenden elektron uzaklaştırarak veya oksijenin elektron spinini değiştirerek spin bariyeri aşılar ve lipid oksidasyonu başlatılır. Sadece iz miktarda katalizöre ihtiyaç duyulduğundan spontan ve katalizörün olmadığı düşünülen birçok durumda aslında kontaminantlar, belirlenememiş veya dikkate alınmamış koşullar etkilidir. Reaksiyonu başlatan veya katalizleyen maddelerden bazıları şöyle sıralanabilir: Metal, ışık, sıcaklık, lipoksigenaz, hem proteinleri ve porfirinler, ozon ve serbest radikaller (Schaich, 2005). Temel haldeki oksijen ve çift bağın spin durumları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Oksijen ve çift bağın triplet ve singlet durumları (Schaich, 2005)

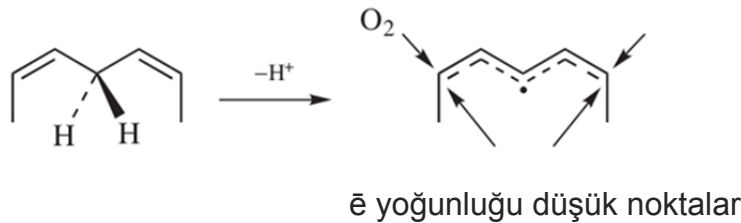
Serbest radikaller tarafından hidrojen koparılması genelde oldukça spesifikdir ve tercihen C-H bağ enerjisinin en düşük olduğu allilik hidrojeninde meydana gelir. Bulunduğu pozisyona göre H bağ enerjisi Çizelge 2.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Açıl zincirinde farklı pozisyonlarda bulunan hidrojenlere ait bağ enerjileri (Schaich, 2005)

	E (kJ/mol)	E (kcal/mol)
H-CH=CH ₂	431	105
H-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	419	99
H-CH ₂ -CH=CH ₂	356	85
R-HCH-CH=CH-CH ₂ -CH ₃	322	77
R(CH ₂ =CH)-HCH-CH ₂ -	310	74
R-CH=CH-HCH-CH=CH-	272	65
ROOH	377	90

2.1.2.2. İlerleme

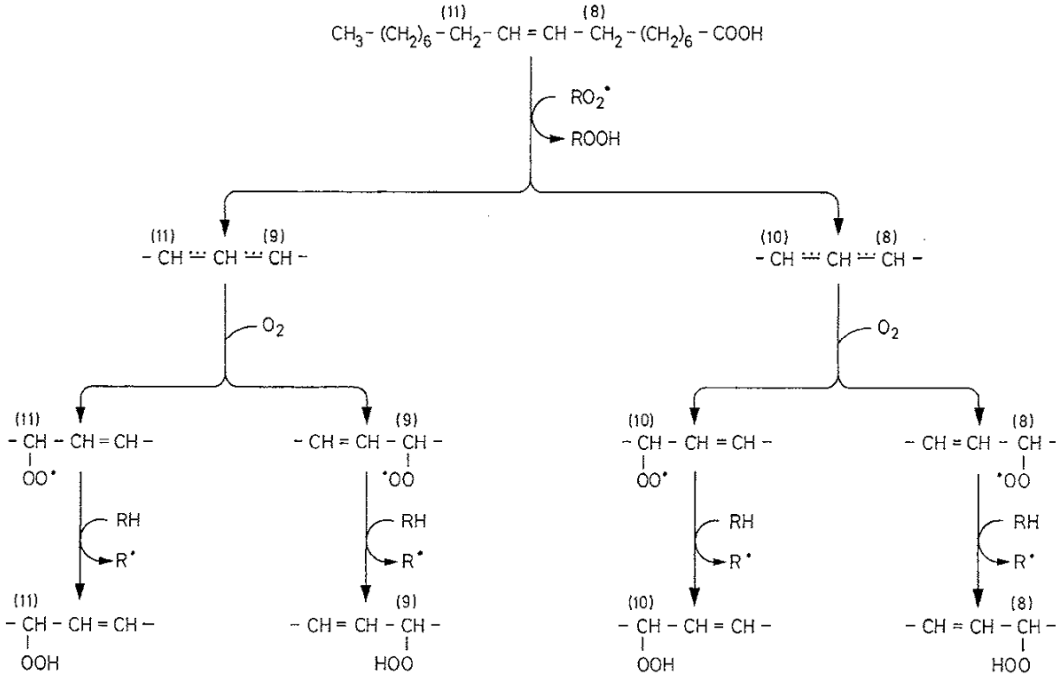
Allilik hidrojenlerin uzaklaştırılması ile serbest kalan elektron rezonansla stabilize edilen çift bağ boyunca dağıtılır. Merkezde elektron yoğunluğu fazlayken, dış pozisyonlarda elektron yoğunluğu kısmen daha düşüktür. Bu nedenle oksijen en dıştaki noktalara bağlanarak peroksil radikali (LOO[·]) oluşturma eğilimindedir (Schaich, 2005).



Şekil 2.3. Oksijenin çift bağa eklenmesi (Schaich, 2005)

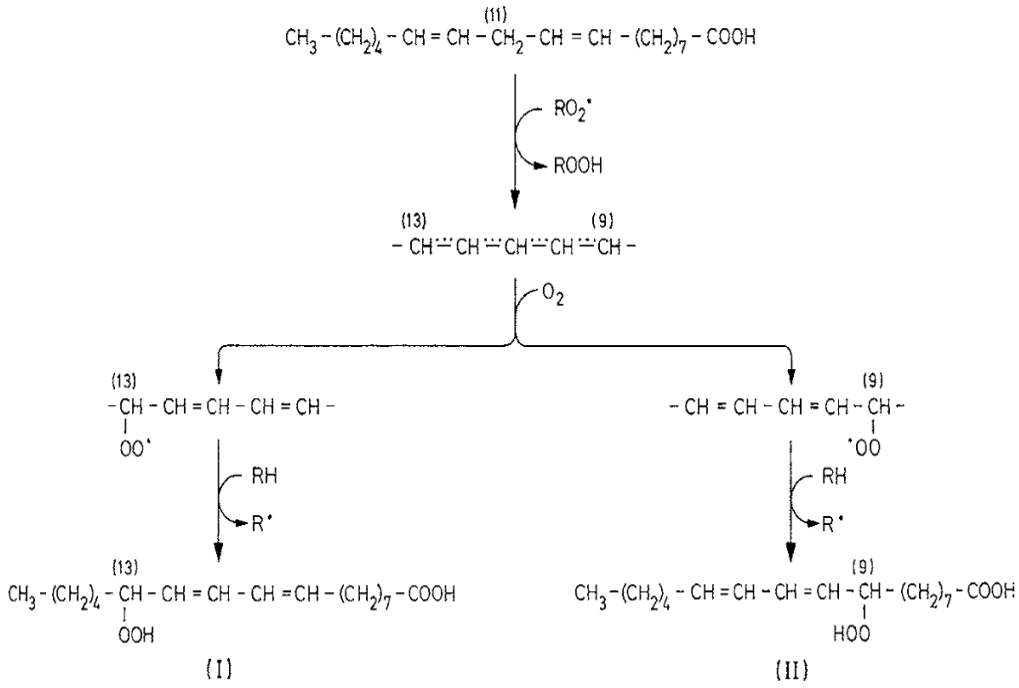
Peroksil radikalleri (LOO[·]) tarafından H transferi

Oleik asit zinciri üzerindeki 8. ve 11. C atomundan H ayrılması ile iki allilik radikal sonrasında allilik radikallere sırasıyla oksijen ve hidrojen eklenmesi sonucu izomerik hidroperoksit karışımı (8-, 9-, 10-, 11-) oluşur. Oluşan bu 4 izomer cis ve trans izomerleri de dikkate alındığında 8 farklı şekilde bulunabilir (Neff et al., 1978; Haslbeck and Grosch, 1983; Frankel et al., 1984; Porter et al., 1994; Eldin et al., 2003). Şekil 2.4'de oleik asitten monohidroperoksitlerin oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Oleik asidin otooksidasyonu ve primer oksidasyon ürünleri (Belitz et al., 2009)

Linoleik asit 1,4-pentadien yapısı nedeniyle propen yapıdaki oleik aside göre oksidasyona daha duyarlıdır. Yağ asidi zincirinde çift bağ varlığı çift bağa komşu karbon atomundaki C-H bağını zayıflatır ve H ayrılmasını kolaylaştırır. Bisallilik C-H bağı için disosiasyon enerjisi $\sim 85 \pm 3$ kcal/mol iken monoallilik C-H bağı için disosiasyon enerjisi ~ 10 kcal/mol daha yüksektir (Reich and Stivala, 1969; Wu et al., 1978; Porter, 1986; Gardner, 1989; Eldin et al., 2003). İki çift bağa komşu pozisyonda bulunan 11. C atomundan H ayrılması ile ara ürün olarak pentadienil radikali, sonrasında 9- ve 13-dien hidroperoksit karışımı oluşur. Oluşan her iki hidroperoksit hem cis-trans hem de trans-trans formlarında bulunabilmektedir. Şekil 2.5'te linoleik asitten monohidroperoksitlerin oluşumu gösterilmiştir.



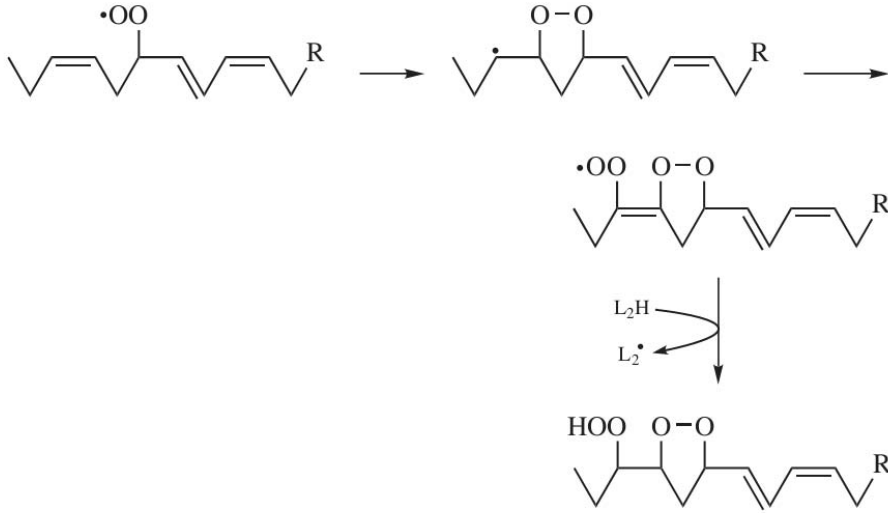
Şekil 2.5. Linoleik asidin otooksidasyonu ve primer oksidasyon ürünleri (Belitz et al., 2009)

Alkil radikalinin (L•) peroksil radikali (LOO•) oluşturmak üzere oksijenle reaksiyonu hızlı gerçekleşirken sonrasında başka bir hidrojen kaynağından (doymamış yağ asitleri, antioksidan gibi) H transferinin yavaş gerçekleşmesi radikal oluşum hızını sınırlandırmaktadır (Knothe, 2007; Belitz et al., 2009).

Peroksil radikalleri tarafından H koparılmasında üç faktör etkilidir: 1- Lipit ve solventte bulunan kullanılabilir H kaynağı 2- Ortam viskozitesi 3- Sıcaklık (Walling and Padwa, 1963; Schaich, 2005). H kaynağı olarak sadece lipit allil gruplarının bulunduğu protonsız solventler için yağ asidi zincirlerinin etkileşiminin arttığı yüksek lipit konsantrasyonunda ve bisallilik H' e sahip çoklu doymamış yağ asitleri varlığında H koparılması kolaylaşmaktadır. Zincir uzunluklarının büyük ölçüde kısaldığı düşük viskozitedeki ortamlarda da H koparılması kolaylaşmaktadır (Factor et al., 1965; Porter et al., 1995; Schaich, 2005). Öte yandan solvent veya sistemdeki diğer bileşikler H içeriyorsa, lipit dışındaki bölgelerden kompetitif olarak H koparılır. Bu durumda radikaller sönmülenerak zincir reaksiyonları devam etmek yerine sonlanmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda ise termal enerji, bağ disosiasyon enerjisini düşürdüğü için H koparılması kolaylaşmaktadır.

Peroksil radikallerinin (LOO[•]) yeniden düzenlenmesi ve siklizasyonu

Özellikle 3 veya 4 çift bağa sahip çoklu doymamış yağ asitlerinde ve peroksil grubu iç pozisyonlarda olan radikallerde siklizasyon görülmektedir. Ortamda uygun H bulunmadığında, peroksil radikalleri molekül içi çift bağlara eklenerek elektron çifti bulur ve halka yapıda bileşikler oluştururlar. Linolenik asit peroksil radikallerinin % 25' inin, araşidonik asit peroksil radikallerinin ise % 33' ünün peroksil grubu iç pozisyonundadır. Bu nedenle linolenik ve araşidonik asidin siklik peroksit oluşturma eğilimi fazladır. Linolenik asit peroksil radikallerinden halka yapı oluşumu Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

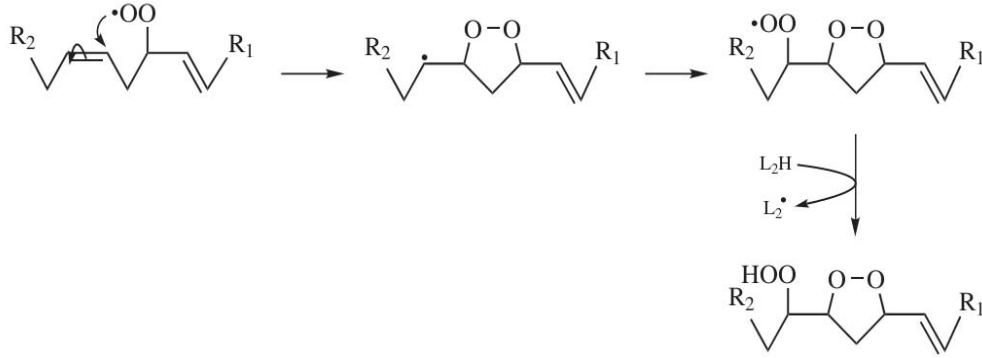


Şekil 2.6. Linolenik asit peroksil radikallerinin siklizasyonu (Schaich, 2005)

Halka yapının oluşmasının ardından oksijen eklenmesi ile sekonder peroksil radikalleri oluşur. Oluşan radikaller bir H kaynağından H kopararak hidroperoksi epidioksitleri oluştururlar. Bu şekilde zincir reaksiyonları devam ettirilir.

Reaksiyon için gerekli *cis*-çift bağ - hidroperoksit yapısı (homoallilik) bulunmadığından linoleik asit otooksidasyon sırasında siklizasyon ile epidioksit oluşturamaz. Fakat linoleik asidin fotooksidasyonu sonucu dış pozisyonlarda (9-, 13-) hidroperoksit oluşumuna yakın miktarda iç pozisyonlarda (10-, 12-) hidroperoksit oluşumu söz konusudur. Hidroperoksit grubu iç pozisyonda bulunan hidroperoksitler siklizasyon için gerekli *cis*-çift bağ yapısına sahiptirler. Bu hidroperoksitlerden H koparılması ile oluşan peroksil radikalleri siklizasyona

uğrayarak yüksek miktarda hidroperoksi epidioksit ve epidioksi-hidroperoksitleri oluştururlar (Frankel et al., 1979; 1982; Mihelich, 1980; Schaich, 2005). Bu oluşum Şekil 2.7'de gösterilmiştir:



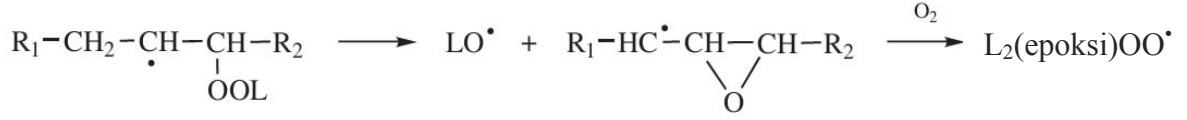
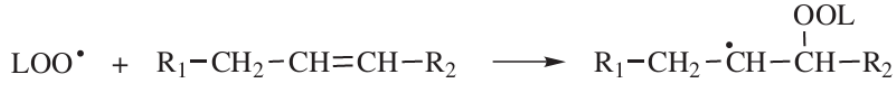
Şekil 2.7. Hidroperoksi epidioksit ve epidioksi-hidroperoksit oluşumu (Schaich, 2005)

Epidioksit-OO• radikalleri çok reaktif olduklarından çok yüksek olmayan sıcaklıklarda bile dimerizasyon eğilimindedirler (Neff et al., 1988; Schaich, 2005). Bu durum analizlerini zorlaştırmaktadır.

Çift bağa peroksil radikalinin (LOO•) eklenmesi

Uygun H miktarı sınırlı olduğunda (protonsuz solventlerde, düşük sıcaklıkta), konjuge, terminal pozisyonda veya 1,1 disüstitüe çift bağ varlığında LOO• eklenme reaksiyonu kompetitif olarak gerçekleşir (Hiatt and McCarrick, 1975; Schaich, 2005). Gardner' a (1989) göre LOO•, oksidasyon ürünlerinin konjuge çift bağlarına olduğu kadar okside olmamış linoleik asit çift bağlarına da eklenerek aynı tip reaksiyon ürünleri oluşturmaktadır (Schaich, 2005).

Peroksil radikallerinin çift bağa eklenmesi sonucu monomer (epoksitler ve epidioksitler), dimer ve polimer reaksiyon ürünleri oluşur. Sonrasında devam eden reaksiyonlarla yeni pozisyonlarda oluşan peroksil ve alkoksi radikalleri, zincir reaksiyonlarının ilerlemesini sağlar.



Şekil 2.8. Peroksil radikallerinin çift bağa eklenmesi (Schaich, 2005)

Peroksil radikalleri çift bağa eklendiğinde 1,3 siklizasyonu sonucu epoksitler ve allilik radikaller sonrasında ise allilik radikallere oksijen eklenmesi ile yeni peroksil radikalleri oluşur (Şekil 2.8.). Oluşan peroksil radikallerine hidroperoksit eklenmesi sonucu polimerizasyon gerçekleşebilir veya H transferi ile stabil dihidroperoksit dimerleri oluşarak radikal zincir reaksiyonları devam eder.

Çift bağa LOO^\bullet eklenmesi ve LO^\bullet siklizasyonu ile oluşan epoksitler majör lipid oksidasyon ürünleri arasında yer almaktadır. Bu reaksiyon sıcaklık, oksidasyon miktarı ve solvent polaritesi arttıkça artmaktadır. (Mounts et al., 1970; Frankel et al., 1988; Haynes and Vonwiller, 1990; Schaich, 2005)

2.1.2.3. Dallanma

Molekül içi düzenlenme ve eklenme reaksiyonları peroksil radikalinin H kopararak hidroperoksite dönüşmesinden önce gerçekleşmektedir. Fakat oksidasyon sırasında alkoksi radikali sadece hidroperoksit dekompozisyonu sonucunda oluşur. Bu nedenle alkoksi radikaline ait reaksiyonlar sekonder reaksiyonlar olarak ifade edilmektedir.

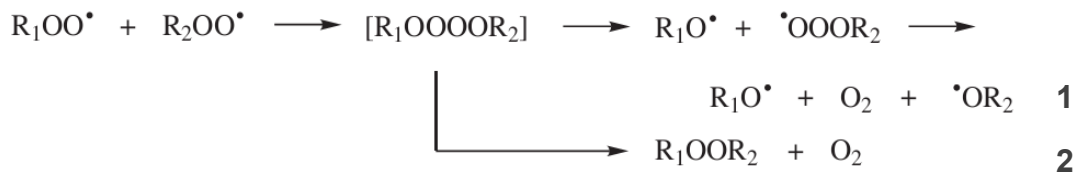
İlerleme aşamasında hidroperoksit oluşum hızı parçalanma hızından daha büyüktür. Hidroperoksit miktarı belirli bir kritik değere ulaştığında, dallanma aşamasında ise hidroperoksit parçalanma hızı daha büyüktür (Schaich, 2005).

Her bir hidroperoksit, peroksit grubunun moleküldeki konumuna bağlı olarak spesifik parçalanma ürünleri oluşturur (Waters, 1971; Schaich, 2005). Sonrasında gerçekleşen oksidasyon ve dekompozisyon reaksiyonlarıyla uçucu, uçucu olmayan, polimerik sekonder oksidasyon ürünleri oluşur.

Hidroperoksit dekompozisyonunun ilk aşamasında hidroperoksit grubundaki O-O bağı koparak alkoksi ve hidroksi radikalleri oluşur. Alkoksi radikali (LO \cdot) peroksil radikaline (LOO \cdot) göre daha reaktiftir fakat hidroperoksit parçalanması devam ettiği sürece ortamda baskın olarak bulunmaktadır. Hidroksil radikali (HO \cdot) ise aşırı miktarda reaktif olup seçici özellik göstermeyerek açıl zinciri boyunca herhangi bir yerden H koparabilir. Ayrıca kolaylıkla çift bağa eklenebilir (Schaich, 2005).

Peroksil radikalinin (LOO \cdot) disproporsiyonu

Peroksil radikallerinin rekombinasyonu sonucunda stabil reaksiyon ürünleri olduğundan bu reaksiyon genellikle sonlanma aşaması içerisinde düşünülür. Fakat stabil reaksiyon ürünlerinden çok yeni alkoksi radikallerinin olduğu 2. reaksiyon (Şekil 2.9.) dikkate alındığında ilerleme aşaması kapsamında da ele alınmaktadır.



Şekil 2.9. Peroksil radikallerinin rekombinasyonu ve disproporsiyonu (Schaich, 2005)

1. reaksiyon okside olmuş lipitlerde, protosuz solventlerde gerçekleşir. Polar solventler veya sulu çözeltilerde β -ayırılma tepkimesi tercih edilir ve LOO \cdot dekompozisyonu önemli ölçüde artar. Bu durumda reaksiyon ilerlemeden çok sonlanma reaksiyonu olarak önem kazanır (Walling et al.,1970; Heijman et al., 1985; Schaich, 2005).

Peroksil radikallerinin (LOO·) β- ayrılma tepkimesi

β- ayrılma tepkimesi ile peroksil radikalinde C-O bağı kırılır ve O₂ açığa çıkar. Linoleik asit için β- ayrılma tepkimesi, allilik pozisyonlardan H transfer edilmesi ile rekabet eder (Porter et al., 1981; Schaich, 2005). β- ayrılma tepkimesinin önem kazandığı bir diğer durum da yüksek sıcaklıklarda izomer dağılımının ve buna bağlı olarak son ürünlerin değişiminde etkili olmasıdır. Isıtma sırasında 13-OOH 9-OOH yönünde izomerizasyon gerçekleşir (Smith and Waters, 1969; Schaich, 2005).

Alkoksi radikalleri (LO·) tarafından H transferi

LO· radikalinin H transferi LOO· radikale göre oldukça hızlı ($k \sim 10^7 - 10^8 \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gerçekleşir. Ayrıca LOO· daha çok bis allilik hidrojenlere etki ederken, LO· hem allilik hem de bisallilik hidrojenlere etki ederek daha az seçici özellik gösterir (Bors et al., 1987; Micheal et al., 1987; Schaich, 2005). Allilik hidrojenler özellikle sekonder alkoksi radikaller tarafından uzaklaştırılma eğilimindedirler. Bu nedenle lipit oksidasyonunda Şekil 2.1'de gösterilen klasik radikal zincir reaksiyonu tercih edilir (Kochi, 1973; Schaich, 2005).



Şekil 2.10. Alkoksi radikalleri tarafından lipit zincirinden H transferi (Schaich, 2005)

LO· radikali tarafından diğer lipit zincirlerinden H uzaklaştırılması, H kaynağı olarak sadece lipit allilik grubunun bulunduğu durumda en etkili şekilde gerçekleşir. Lipit miktarının orta seviyede olması halinde, H koparılması iç düzenleme ve ayrılma reaksiyonları ile rekabet ederken düşük miktarda lipit olması durumunda önemsiz hale gelir (Walling and Padwa, 1963; Kulik et al., 1998; Schaich, 2005).

LO· lipit hidroperoksitlerinden H uzaklaştırarak hidroperoksit parçalanmasında ve dallanma reaksiyonlarının başlamasında etkilidir. Hidroperoksit hidrojeni için bağ disosiasyon enerjisi allilik hidrojene göre daha yüksek olmasına rağmen LO· ve

LOOH arasındaki H bağı, kopma için gereken aktivasyon enerjisini büyük ölçüde azaltır (Avila et al., 1995; Schaich, 2005).



Şekil 2.11. Alkoksi radikalleri tarafından hidroperoksitlerden H transferi (Schaich, 2005)

Bol miktarda H kaynağı içeren solventlerde LO[•] tarafından H koparılması daha hızlı gerçekleşir fakat reaksiyonun zincir reaksiyonlarının gelişmesindeki etkisi azalır.

Yüksek sıcaklıklar (T>100 °C) H uzaklaştırılmasından çok ayrılma reaksiyonlarını artırdığından yüksek sıcaklıklarda oksidasyonun sekonder aşamaları baskın hale gelmektedir

Alkoksi radikallerinin (LO[•]) yeniden düzenlenmesi ve siklizasyonu

Alkoksi grubundaki oksijenin komşu çift bağı eklenmesi ile siklizasyon gerçekleşir ve epoksit, epoksiallilik radikaller oluşur. Reaksiyon Şekil 2.12.'de görülmektedir.



Şekil 2.12. Alkoksi radikallerinin siklizasyonu (Schaich, 2005)

LO[•] siklizasyonu ile epoksit oluşumu, lipit miktarı düşük olduğunda (Mayo et al., 1967) veya yüzeyde yoğunlaştığında (Wu et al., 1977; 1978), oda sıcaklığında (Bors et al., 1984), oksijen basıncının düşük olduğu durumlarda, (Mayo et al., 1967) proton içermeyen solventler için baskın reaksiyon olmaktadır (Schaich, 2005).

Oda sıcaklığında siklizasyon reaksiyonları baskınken sıcaklık arttıkça H transferi ve ayrılma reaksiyonları önem kazanır. 100 °C' den yüksek sıcaklıklarda yeniden düzenleme reaksiyonları minör etkiye sahiptirler. Fotooksidasyon sonucu yüksek

konsantrasyonlarda siklik ürün oluşur (Neff, 1980). Bu ürünlerin seviyesi ve pozisyonel dağılımı otooksidasyon ve fotooksidasyonun ayrılmasında belirleyici olabilir.

Alkoksi radikallerinin (LO•) çift bağa eklenmesi

Çift bağa alkoksi radikali eklenmesi (Şekil 2.13.) peroksi radikali eklenmesi kadar kolay gerçekleşmemektedir. Alkoksi radikalleri allilik atak reaksiyonlarını tercih etme eğiliminde olduklarından allilik hidrojenler olduğu sürece H transferi ve iç düzenlenme reaksiyonları baskın olmaktadır.

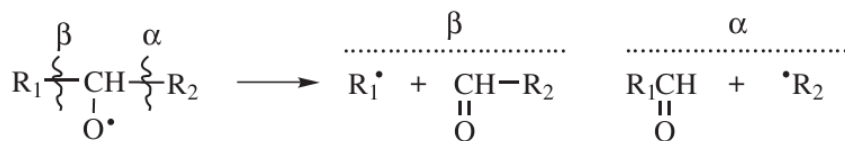


Şekil 2.13. Alkoksi radikallerinin çift bağa eklenmesi (Schaich, 2005)

Eklenme reaksiyonu, daha çok lipid zinciri ve organik solventlerde önemli ölçüde gerçekleşmektedir. Sulu çözeltilerde de ayrılma ve yeniden düzenlenme reaksiyonlarına kıyasla az miktarda bu reaksiyonlara rastlanmaktadır.

Alkoksi radikallerinin (LO•) β-ayrılma tepkimesi

β-ayrılma tepkimesi ile alkoksi grubunun herhangi bir tarafındaki C-C bağı kırılır. Reaksiyon sonucunda karbonilli moleküller, serbest radikaller, aldehitler, alkanlar, okzo-esterleri içeren ürün karışımı meydana gelir (Chan et al., 1976; Schaich, 2005). Alkoksi radikallerinin β-ayrılması aldehit grubundaki oksidasyon ürünlerinin ana kaynağıdır.

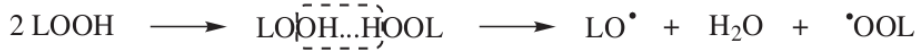


Şekil 2.14. Alkoksi radikallerinin β-ayrılma tepkimesi (Schaich, 2005)

Ayrılma sonucu oluşan bazı radikaller yeniden düzenlenerek radikal olmayan ürünlere dönüşürler fakat çoğu H kopararak radikal zincir reaksiyonlarını devam ettirir. Doymamış parçalanma ürünleri özellikle konjuge dien yapıda olanlar oksidasyon eğiliminde olduklarından gerçekleştirdikleri reaksiyonlar ile zincir dallanmasına katkı sağlarlar. Radikallerin solventten H koparması, reaksiyon için yürütücü kuvvet olmakta, ayrılma reaksiyonları polar solventlerde nonpolar organik solventlere göre 10-100 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Baignee et al., 1983; Baciocchi et al., 2002). Yüksek sıcaklıklarda alkoksi radikallerin β-ayrılması oksidasyonun ilerlemesine büyük ölçüde katkı sağlamaktadır (Kochi, 1973; Schaich, 2005).

Peroksit (LOOH) dekompozisyonu

Yüksek peroksit konsantrasyonunda, peroksit molekülleri H bağı ile birleşerek dimer oluşturur. Daha sonra bimoleküler dekompozisyon sonucunda oksidasyon büyük ölçüde hızlandırılır (Hiatt and McCarrick, 1975; Sliwiok, 1974; Schaich, 2005). Şekil 2.15'te dimerleşme ve parçalanma reaksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Peroksitlerin dekompozisyonu (Schaich, 2005)

2.1.2.4. Sonlanma

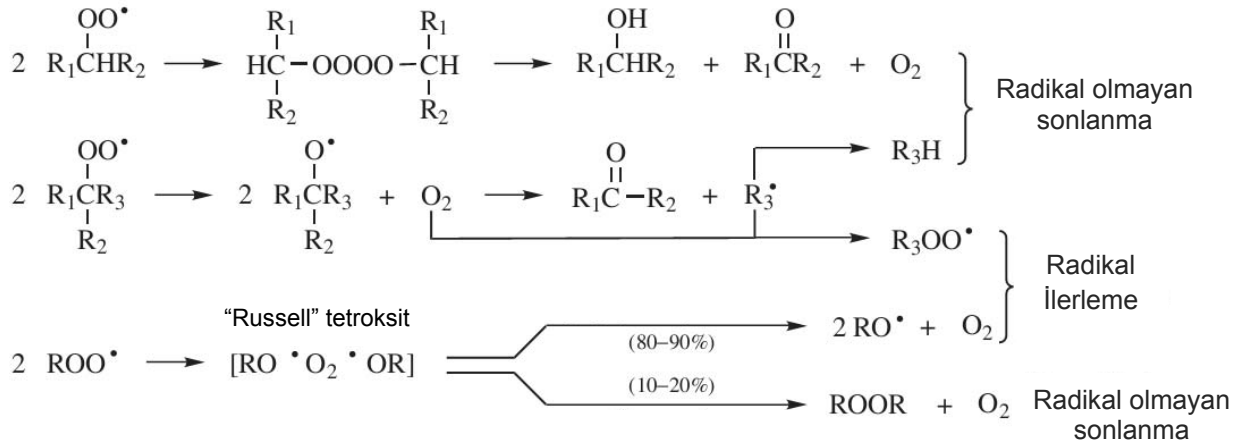
H uzaklaştırılması veya radikal sönmüleme reaksiyonları yeni radikal oluşumundan daha hızlı gerçekleşiyorsa oksidasyon yavaşlamaya başlar fakat radikal zincir reaksiyonlarının tamamen durdurulması zordur. Bu nedenle sonlanma, terminasyon terimi bütün reaksiyondan çok tek bir radikal için kullanılmaktadır.

Radikal rekombinasyonları ve stabil olmayan reaksiyon ürünlerinin H ile birleşmesi ile stabil reaksiyon ürünleri oluşmaktadır.

Sıcaklık ve oksijen basıncı radikal rekombinasyon iz yolunun belirlenmesinde kilit öneme sahiptir. Alkil radikali (L[•]) reaksiyonları, düşük oksijen miktarı ve yüksek

sıcaklıkta (oksijen çözünürlüğü azalır) baskınken oksijen basıncının yüksek olduğu durumlarda peroksil radikali (LOO·) reaksiyonları artmaktadır (Bolland, 1949; Schaich, 2005).

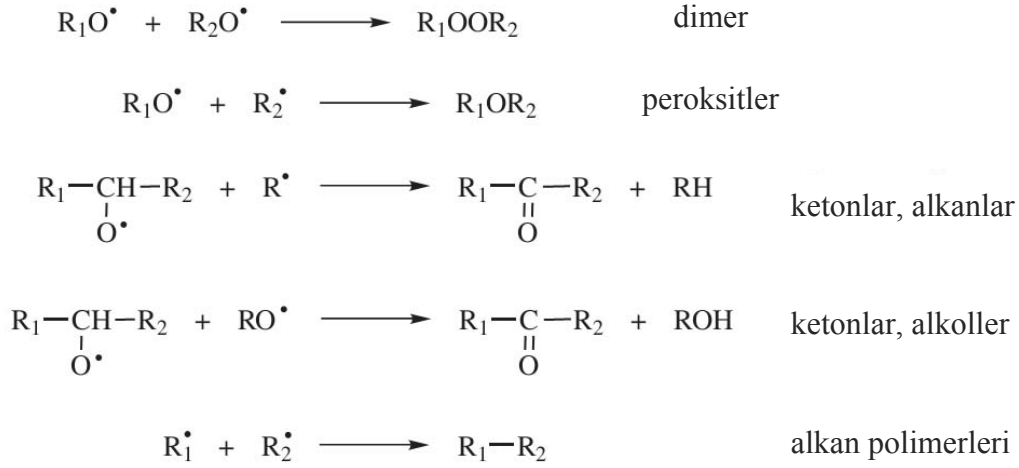
Sekonder peroksil radikalleri hızlı bir şekilde birleşerek ($2k=10^8-10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) alkol, keton, alkan, açıl peroksit ve peroksil radikalleri gibi birçok farklı ürün grubunu oluştururlar (Schieberle et al., 1979; Grosch et al., 1984; Schaich, 2005). Şekil 2.16'da peroksil radikallerinden radikal ve radikal olmayan ürünlerini oluşumu için önerilen mekanizma verilmiştir:



Şekil 2.16. Peroksil radikallerinden radikal ve radikal olmayan ürünlerin oluşumu (Schaich, 2005)

LOO· rekombinasyonu sadece oleik asit için temel sonlanma reaksiyonudur. Doymamışlık derecesi arttıkça iç düzenlenme reaksiyonlarına (epoksit vd. oluşumu) eğilim artmaktadır.

Oksijen basıncı sınırlandırıcı olmadığı sürece LOO[•] rekombinasyonu ilerleme reaksiyonu niteliğindedir ve reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünlerin oluşumu azdır. Sıcaklık arttığında ise β ayrılma tepkimesi ile peroksil radikalden oksijenin uzaklaşması baskın hale gelir. Alkoksi ve alkil radikallerinin rekombinasyonu için önerilen bazı mekanizmalar Şekil 2.17’de gösterilmiştir:



Şekil 2.17. Alkoksi ve alkil radikallerinin rekombinasyonu (Schaich, 2005)

Lipit molekülleri polar veya nonpolar solventler içerisinde seyreltik olarak bulunuyorsa rekombinasyon reaksiyonları önemini kaybetmektedir. Peroksil ve alkoksi radikalleri herhangi uygun bir kaynaktan, lipit olmayan moleküller de (amino asitler, nükleik asitler, antioksidanlar, karotenoidler, karbonhidratlar) dahil olmak üzere H koparabilirler (Gardner et al., 1972; 1976; Yang and Schaich, 1996). Bu durumda lipit radikali sönmülenerak radikal zincir reaksiyonları durdurulur. Fakat protein veya karbonhidrat gibi lipit olmayan moleküllere radikal transferi olduğundan lipitlere benzer oksidasyon prosesi bu moleküllerde de meydana gelir. Bu açıdan düşünüldüğünde lipitler gıdalarda ve biyolojik sistemlerde geniş çaplı oksidatif hasara neden olmaktadır (Karel et al., 1975; Pryor, 1978).

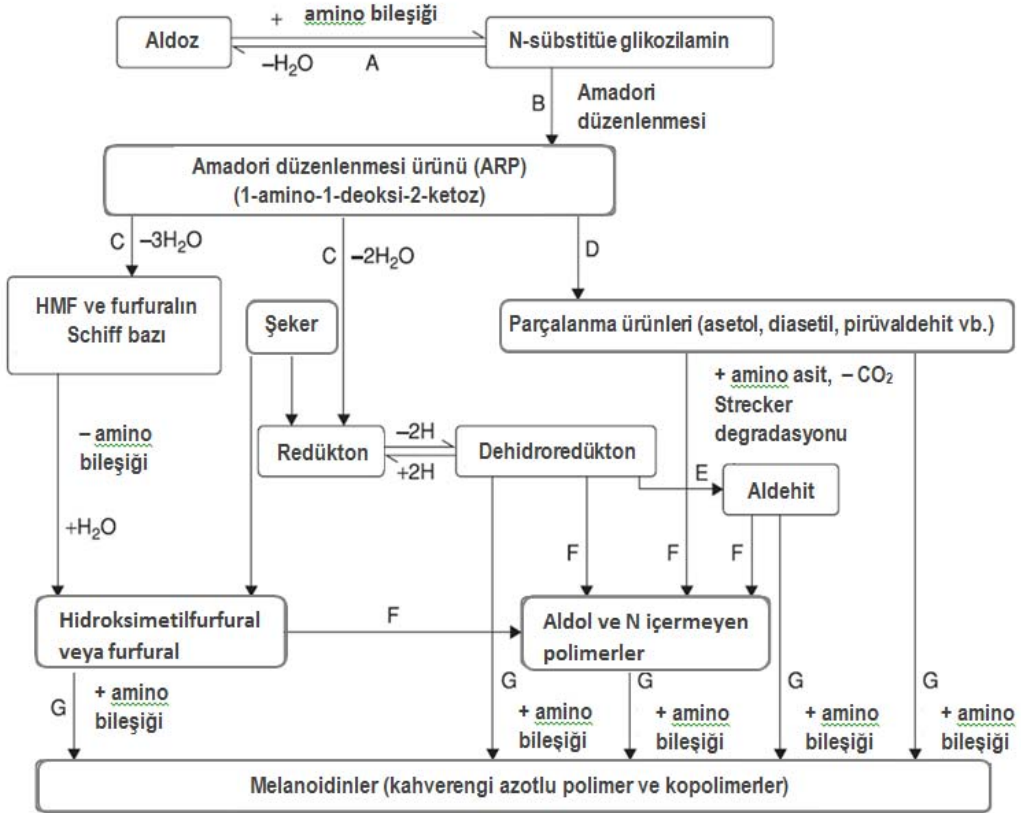
2.3. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları

Esmerleşme reaksiyonları gıdanın işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen en önemli kimyasal olaylar arasında yer almaktadır. Başlıca enzimatik ve E.O.E. reaksiyonları olarak iki gruba ayrılırlar (Manzocco et al., 2001; Hui et al., 2006). Gıdaların E.O.E. reaksiyonları, farklı gıda bileşenlerinin kompleks kimyasal reaksiyonları sonucu meydana gelir. Genel olarak, bu tip esmerleşmenin karbonhidrat-protein reaksiyonları (Maillard reaksiyonu) sonucunda oluştuğu düşünülse de diğer gıda bileşenlerinin de farklı mekanizmalarla E.O.E. reaksiyonlarında yer aldığı gösterilmiştir (Hidalgo and Zamora, 2000). Maillard reaksiyonu, karamelizasyon, askorbik asit degradasyonu, lipit oksidasyon ürünleri ve amino grupları arasında gerçekleşen ve lipit esmerleşmesi olarak da adlandırılan reaksiyonlar bu başlık altında yer almaktadır.

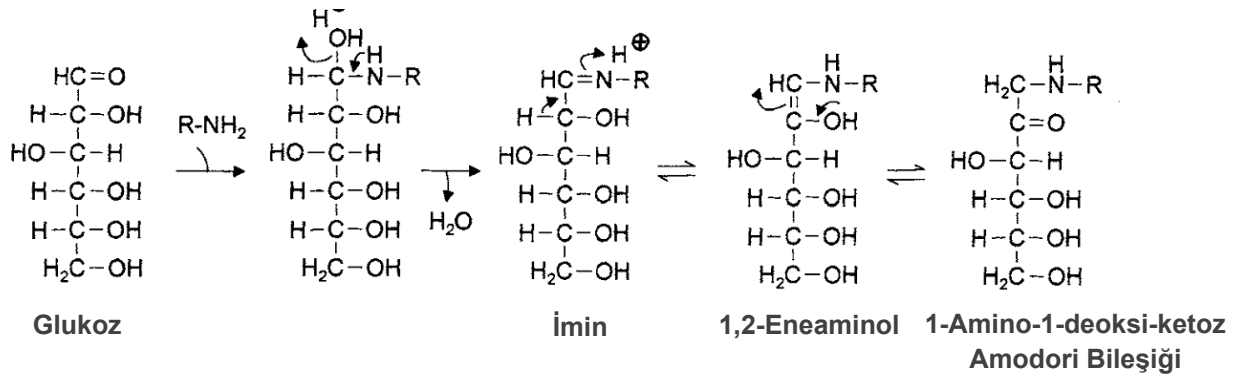
2.3.1. Maillard reaksiyonu

Maillard reaksiyonu amino asit, peptit ve proteinlerin serbest amino grupları ve indirgen şekerlerin karbonil grupları arasında gerçekleşir. Reaksiyon başlangıç, ara, ileri ve sonlanma olmak üzere dört ana aşamadan oluşur. Reaksiyonunun farklı basamaklarını gösteren genel reaksiyon şeması Şekil 2.18.'de gösterilmiştir.

Başlangıç aşamasında nükleofilik özellikte olan primer amino grupları karbonil grupları ile kondense olur ve bir molekül su kaybederek iminleri (Schiff bazı) oluştururlar. α pozisyonunda hidroksil grubu bulunmasından dolayı (Şekil 2.19.) iminler yeniden düzenlenme reaksiyonları ile 1,2-eneaminoller ve sonrasında 1-amino-1-deoksi-2-ketozları (Amadori bileşikleri) oluştururlar. Fruktoz gibi ketoz bir şeker benzer şekilde amino grubu ile reaksiyona girdiğinde 2-Amino-2-deoksi-1-aldozlar (Heyns bileşikleri) oluşur. Bu bileşikler iminlere kıyasla daha stabil özellik gösterirler (Belitz et al., 2009). Amadori bileşikleri, karakteristik flavor, aroma ve kahverengi polimerlerin oluşmasında etkili olan birçok bileşiğin prekürsör molekülüdür. Duyusal değişiklikler meydana gelmeden önce oluştuklarından, Maillard reaksiyonunun neden olduğu kalite değişikliklerinin erken tespiti için indikatör olarak kullanılabilirler (Olano and Martinez-Castro, 1996; Hui et al, 2006).

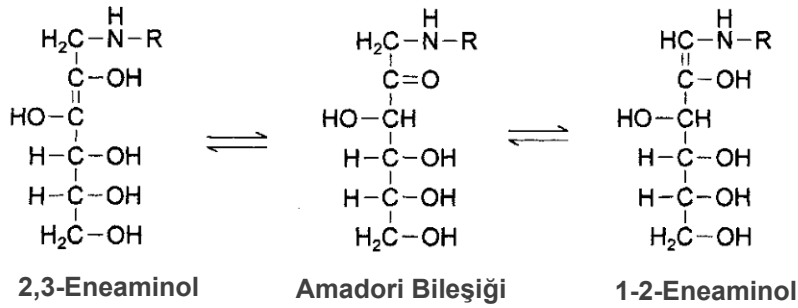


Şekil 2.18. Maillard reaksiyonunun farklı bölümleri (Hodge 1953, Ames 1990)

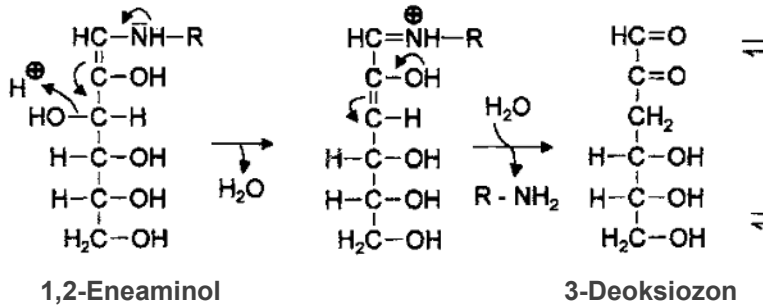


Şekil 2.19. Amadori bileşiği oluşumu

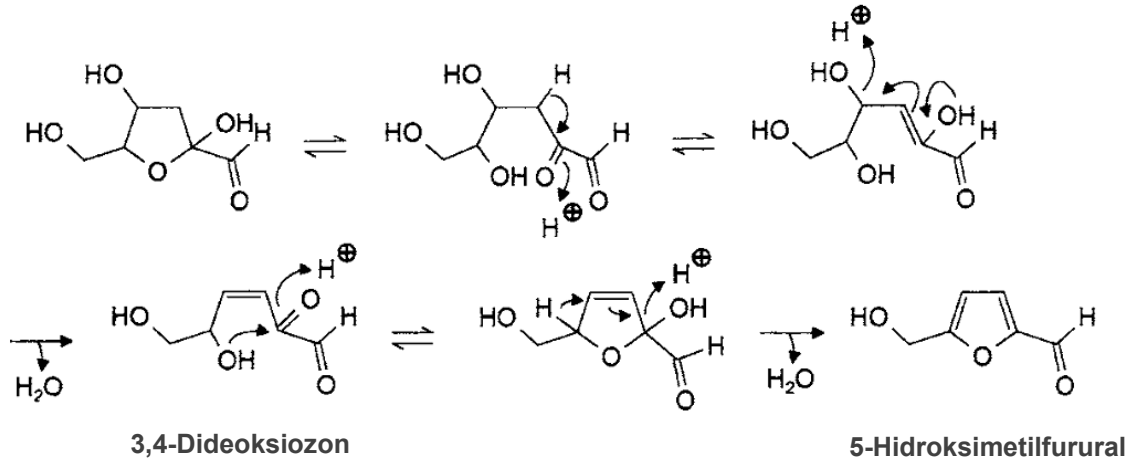
Ara aşamada Amadori bileşikleri parçalanır ve çeşitli degradasyon ürünleri, reaktif ara ürünler (3-deoksiozon), uçucu bileşikler oluşur. Amadori bileşikleri, 1-, 3-, 4-deoksidikarbonillere (deoksiozonlar) degrade olurlar. 1-amino-1-deoksi-2-ketozlar (Amadori bileşikleri), enolizasyon ile 1,2-eneaminol (pH≤7) ve 2,3-eneaminollere (pH>7) dönüşürler (Şekil 2.20.). 1,2-eneaminolden su ayrılması ve imin katyonunun hidrolizi ile 3-deoksi-1,2-diuloz (3-deoksiozon) oluşur (Şekil 2.21.). 2,3-eneaminol iki farklı β-eliminasyon tepkimesi vermektedir. Retro-Michael reaksiyonu ile 1-deoksi-2,3-diuloz (1-deoksiozon) veya 4. C atomundan su ayrılması ile 4-deoksi-2,3-diuloz (4-deoksiozon) oluşabilir.



Şekil 2.20. Amadori bileşiğinin enolizasyonu (Belitz et al., 2009)



Şekil 2.21. 3-Deoksiozon oluşumu (Belitz et al., 2009)



Şekil 2.22. 5-Hidroksimetilfural oluşumu (Belitz et al., 2009)

Maillard reaksiyonunun ileri aşamasında siklizasyon, izomerizasyon, dehidrasyon, kondensasyon, retro-aldolizasyon, yeniden düzenlenme reaksiyonları gerçekleşir. 3-deoksiozonun dekompozisyonu ile HMF, furfural, pirol ve piridin oluşur. HMF oluşumu Şekil 2.22.'de gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonda amonyak, primer amin veya amino asit varlığında 3-deoksiozon tercihen pirol ve piridin türevlerini oluşturmaktadır (Belitz et al., 2009).

pH>7 olduğunda 2,3-enolizasyon sonucunda redüktonlar (4-hidroksi-5-metil-2,3-dihidrofuran-3-on gibi) ve çeşitli parçalanma ürünleri (asetol, pirüvaldehit, diasetil gibi) oluşur. Oluşan bu bileşiklerden birçoğu reaktif olup daha fazla reaksiyona girme eğilimindedir. Karbonilli bileşiklerde, karbonil grupları serbest amino grupları ile kondense olarak N içeren reaksiyon ürünlerinin oluşmasını sağlar. α -dikarbonil yapıdaki (deoksiozonlar gibi) bileşikler ve amino asitler arasında Strecker reaksiyonu sonucu Strecker aldehitleri ve α -aminoketonlar oluşur (Martins et al., 2001).

Sonlanma aşamasında azot içeren kahverengi polimerler, kopolimerler (melanoidinler) meydana gelir. Melanoidinler, lizin ve arjininin ϵ -amino grubundan proteinlere çapraz bağlanarak yüksek molekül ağırlığında melanoidin polimerlerini oluştururlar. Melanoidinlerin, Maillard reaksiyonunun ileri aşamasında oluşan ve polikondensasyon reaksiyonları ile birbirine bağlanan, tekrarlanan furan ve pirol ünitelerinden meydana geldiği öne sürülmektedir (Martins and Boekel, 2003; Hui et al., 2006). Renkli reaksiyon ürünleri arasında karbonhidrat degradasyon

ürünlerinin de (deoksiozon, metilgliokzal, gliokzal, hidroksi-2-propanon, 3-hidroksi-2-bütanon, glikoaldehit) yer aldığı tespit edilmiştir (Hoffman, 1999; Martins et al., 2001).

Maillard reaksiyonu gıdalarda arzu edilen (ekmek ve kahvede olduğu gibi) ve edilmeyen (kondense süt, kurutulmuş çorbalarda olduğu gibi) flavor, aroma ve renk maddelerinin oluşumunu sağlarken aynı zamanda gıda güvenliği ve besinsel kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu reaksiyon amino asit yıkımına ve protein sindirilebilirliğinde azalmaya neden olarak gıdanın besinsel kalitesini düşürmekte (Malec et al., 2002), mutajenik bileşiklerin (dikarboniller, metilgliokzal gibi) oluşumu ile gıda güvenliğini azaltmaktadır (Martins et al., 2001).

Reaksiyon sonucunda ayrıca redüktonlar gibi antioksidan özellikte, proteinlerle çapraz bağ oluşturabilen bileşikler meydana gelmektedir (Belitz et al., 2009).

2.3.2. Lipit oksidasyonu ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu

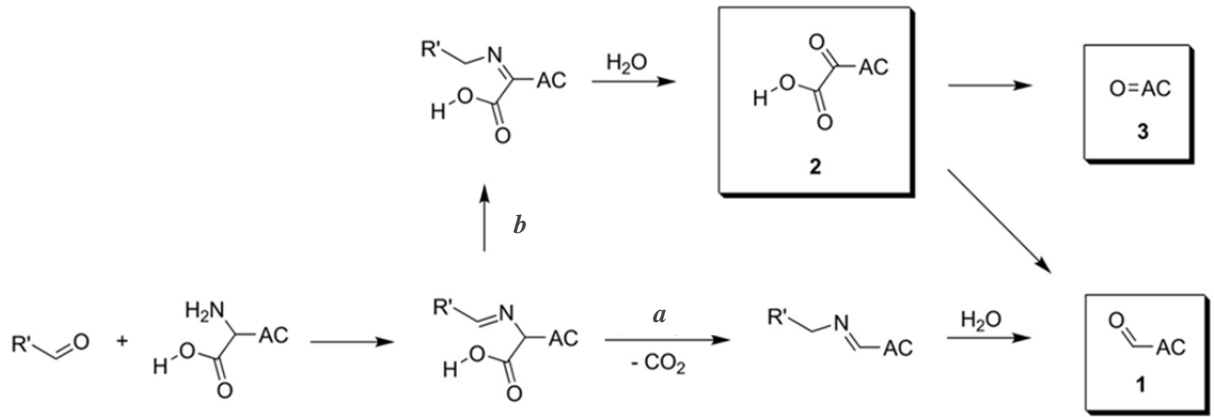
Maillard reaksiyonu ve lipit oksidasyonu karmaşık reaksiyon ağına sahiptir. Her iki reaksiyon sonucunda da çok farklı miktarda bileşiklerden oluşan kompleks bir ürün karışımı ile gıdanın duyusal özellikleri ve besin değerinde pozitif ya da negatif değişiklikler olmaktadır (Hidalgo and Zamora, 2005). Lipitlerin oksidasyon ürünleri polimerizasyon ile kahverengi renkte oksipolimerleri oluştururlar (Khayat and Schwall, 1983; Hui et al., 2006) fakat ortamda amino asit, peptit veya protein bulunması halinde lipit oksidasyon ürünlerinden farklı ürünlerin oluştuğu tespit edilmiştir (Gillatt and Rossell, 1992; Hui et al., 2006). Bu durumda lipit oksidasyonu ve okside lipit-amino asit reaksiyonları eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Hidalgo and Zamora, 2002).

Özellikle balık, et ve et ürünleri gibi gıdalarda, depolama ve proses sırasında okside yağ asidi ve amino grupları arasında reaksiyon olduğuna dair bulgular mevcuttur (Hidalgo et al., 1992; Nawar, 1996). Ayrıca insan ve hayvanlarda da artan lipofuksin (yaşa bağlı olarak oluşan sarı-kahverengi pigmentler) birikimi ile görülen esmerleşmenin bu reaksiyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Yin, 1996; Hui et al., 2006).

Lipit oksidasyonunun başlangıç aşamasında oluşan hidroperoksitlerin parçalanması sonucu karbonil gruba sahip sekonder reaksiyon ürünleri (aldehitler, ketonlar...) oluşmaktadır. Oluşan karbonilli bileşikler karbonhidrat kaynaklı karboniller gibi nükleofilik amino gruplarla reaksiyona girerek Maillard reaksiyonuna benzer reaksiyon serisi ile esmerleşmeye neden olurlar (Hidalgo and Zamora, 2011). E.O.E.'ye neden olduğu tespit edilen ilk sekonder lipit oksidasyon ürünü malondialdehittir. Chio ve Tappel (1969) malondialdehit ve iki amino grubu arasında çapraz bağlanma ile Schiff bazı ve N,N'-disübstitüe 1-amino-3-iminopropen oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca uzun zincirli okside lipit ve amino asitler, proteinler arasında da bu reaksiyonun gerçekleştiği bilinmektedir (Gardner et al., 1976; 1977; Hidalgo and Zamora, 1987; 1995; 2000).

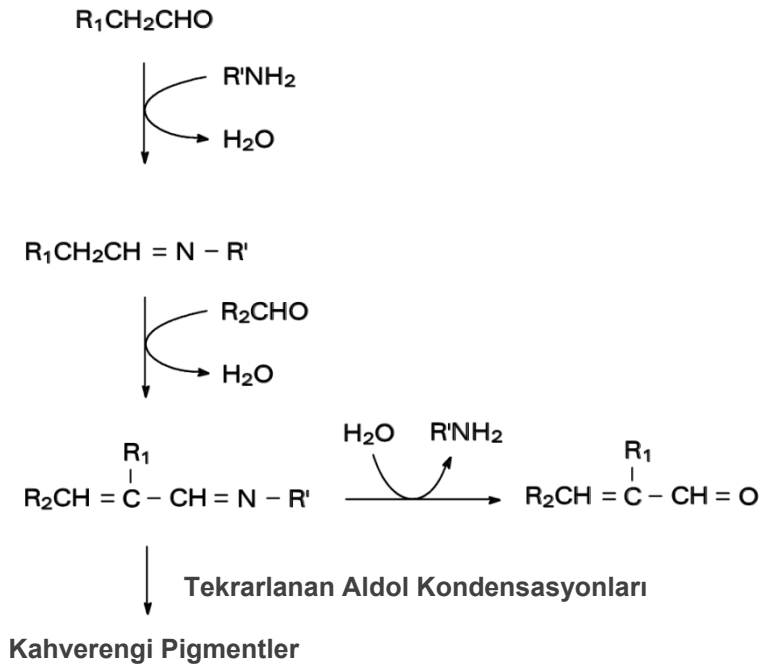
Maillard reaksiyonu ara ürünleri olan dikarbonil ve hidroksikarboniller ile amino asitlerin dekarboksilasyon ve deaminasyon reaksiyonları Strecker degradasyonu olarak bilinmektedir. Benzer şekilde lipit oksidasyon ürünleri de amino asitlerle reaksiyona girerek Strecker aldehitlerini oluşturmaktadır (Şekil 2.23-1).

Reaksiyon Şekil 2.23'te verilen a izyolu üzerinden yürümektedir. İlk basamakta lipit karbonili ve amino asitten imin oluşumu ile su açığa çıkmaktadır. Daha sonra karbondioksit ayrılması ve elektronik düzenlenmeler ile Strecker aldehitinin prekürsörü olan yeni bir imin oluşumu gerçekleşmektedir (Şekil 2.23.). Bir sonraki aşamada hidrolitik parçalanma ile Strecker aldehiti oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar sırasında piridin ve pirol türevlerinin oluştuğu ve bu bileşiklerin gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime neden olduğu belirtilmiştir. Dekarboksilasyon olmadan benzer bir degradasyon, b izyolu üzerinden gerçekleşir. Bu reaksiyonlar sonucunda α -keto asit oluşmaktadır. α -keto asit termal stabilitesi düşük bir moleküldür. Bu nedenle ılımlı koşullar altında yeni flavor moleküllerinin oluşumu söz konusudur.



Şekil 2.23. Lipit oksidasyon ürünü ve amino asitlerin reaksiyonu (Zamora and Hidalgo, 2011)

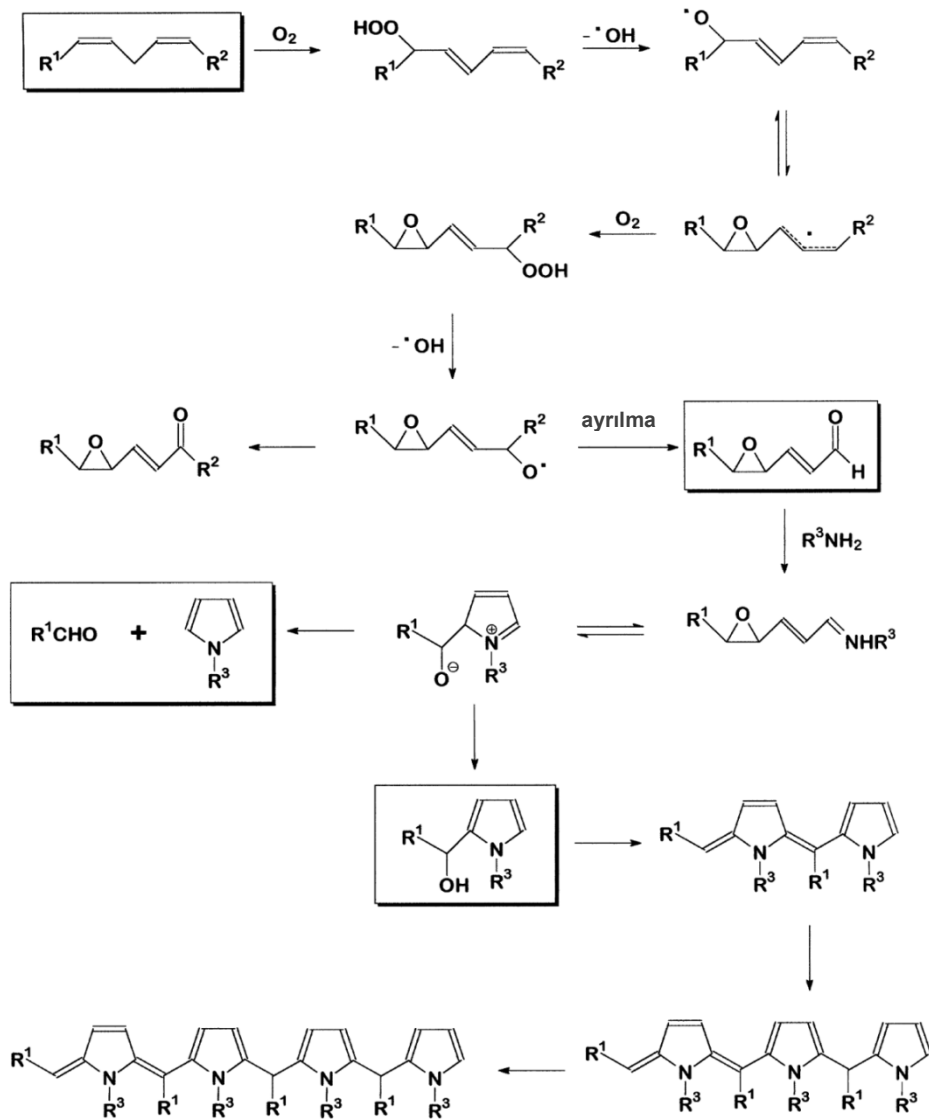
Kahverengi polimerlerin oluşumu için önerilen ilk mekanizma tekrarlanan aldol kondensasyonudur (Şekil 2.24.). Bu mekanizmaya göre lipit karbonilleri proteinlerin serbest amino grupları ile kondense olarak Schiff bazlarını oluştururlar. Schiff bazları da aldol kondensasyonu ile polimerize olarak dimerleri ve yüksek molekül ağırlığında kahverengi makromolekülleri oluştururlar. Stabil olmayan kahverengi polimerler gıdanın işlenmesi veya pişirilmesi sırasında parçalanma veya dehidrasyon ile gıdanın flavor özelliklerini etkileyen, yeni uçucu bileşiklere dönüşürler.



Şekil 2.24. Aldol kondensasyonu ile kahverengi pigmentlerin oluşumu (Hidalgo and Zamora, 2000)

Önerilen diğ er mekanizma ise N-sübstitüe hidroksialkil pirollerin (2- 1-hidroksialkil pirol) spontan polimerizasyonudur (Ş ekil 2.25.). Epoksialkenal (4,5-epoksi-2-alkenal gibi) ve doymamış epoksiketo yağ asitlerinin amin, amino asit, proteinlerle reaksiyonu sonucu N-sübstitüe hidroksialkil piroller ve daha stabil özellikte N-sübstitüe piroller üretilir. N-sübstitüe hidroksialkilpiroller kolayca polimerize olarak melanoidin benzeri kahverengi makromolekülleri oluştururlar. Pirol oluşumu ve sonrasında bir miktar polimerizasyonun gerçekleşmesi maksimum renk ve floresans oluşumundan önceki son aşamadır. Polimerik yapıların dışında düşük molekül ağırlığındaki monomerlerin de renk oluşumunda etkili olduğu belirtilmektedir (Hidalgo et al., 1993; 1994; 1995; 2000). Kısa zincirli aldehitler bu monomerlere örnek olarak verilebilir. 4,5-epoksi-2-alkenal Ş ekil 2.25.'de verilen iz yoluna göre proteinlerle reaksiyona girerek pirol ve Michael eklenme ürününü oluşturur (Hidalgo and Zamora, 1994; 1999b).

4,5-epoksi-2-alkenaller lipit oksidasyonu ara ürünü olan epoksihidroperoksi yağ asitlerinin dekompozisyonu sonucu oluşurlar (Ş ekil 2.25.). Bu konu kapsamında çalışılan diğ er bazı lipit oksidasyonu ürünleri şu şekildedir: 2-alkenaller, 4-hidroksialkenaller, 2,4-dekadienal, 3-(2-etil-5 hidroksi-3-okzo-siklopentil)-2-propenal, hekzanal.



Şekil 2.25. N-sübstitüe hidroksialkilpirollerin oluşumu ve polimerizasyonu (Zamora and Hidalgo, 2005)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasallar ve Malzemeler

2,4-dekadienal Sigma-Aldrich (İsrail), metanol, asetonitril Sigma-Aldrich (ABD), furozin Neosystem Laboratuvarı (Strazburg, Fransa), HMF Acros (Geel, Belçika) firmasından temin edilmiştir.

Hidroklorik asit (8 N), silika jel ve amino asit analizi için kullanılan amino asit standartları; Alanin (Ala), arjinin (Arg), asparajin (Asn), aspartik asit (Asp), sistein (Cys), glutamik asit (Glu), glutamin (Gln), glisin (Gly), histidin (His), izolösin (Ile), lösin (Leu), lisin (Lys), metionin (Met), fenilalanin (Phe), prolin (Pro), serin (Ser), treonin (Thr), triptofan (Trp), tirozin (Tyr), valin (Val) ve teanin (The) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Formik asit (98%), J.T.Baker (Deventer, Hollanda) firmasından temin edilmiştir.

Naylon filtreler (0.45 µm), Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşları, Atlantis T3 kolon (250 x 4,6 mm, 5 µm), Atlantis dC18 kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm) Waters (Millford, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Hypersil Gold kolon (100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm) Thermo Scientific (San Jose, CA, ABD) tarafından sağlanmıştır.

Deneylerde ultra saf su (MilliQ sistemi, Millipore, Bedford, MA, ABD) kullanılmıştır.

Carrez I çözeltisi 15 g potasyum hekzasiyanoferratin 100 mL suda çözünmesiyle,

Carrez II çözeltisi 30 g çinko sülfatın 100 mL suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

Fındık, kabuklu olarak yerel bir üreticiden (Giresun) temin edilmiştir.

3.2. Fındık Yağının Termal Oksidasyonu

Oksidasyon ürünlerinin izlenmesi amacıyla 5' er mL ticari fındık yağı cam tüplere aktarılıp, kapakları kapatıldıktan sonra yağ banyosunda (Memmert, Almanya) 150 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 6 saat süreyle okside edilmiştir. Model sistemlerde kullanılmak üzere ise 10' ar mL ticari fındık yağı cam tüplere aktarıldıktan sonra aynı yöntemle 180 °C'de 3 saat okside edilmiştir.

3.3. Model Sistemlerin Hazırlanması

Model reaksiyon sisteminin hazırlanması için cam tüp içerisine yaklaşık 50 mg silika jel aktarılmış üzerine 10 µmol lizin içeren 100 µL lizin çözeltisi ve 100 µL/1-1,5-2 mL farklı oksidasyon seviyelerinde fındık yağı ilave edilmiştir. Lizin çözeltisi için eppendorf tüpüne 18,26 mg lizin tartılmış ve deiyonize su ile 1 mL hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 2 dakika vortekslelendikten sonra üzerine 300-350 mg silika jel ilave edilmiştir. Phe, Arg, Leu, Ser amino asitleri de, lisine benzer şekilde hazırlanarak model sistemlerde kullanılmıştır. Sadece lizin ve sadece fındık yağı içeren sistemler reaksiyon sistemine benzer olarak, eşit miktar ve hacimde lizin ya da fındık yağı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kapakları kapatılan cam tüpler yağ banyosunda, 180 °C'de 10, 30, 60 dakika süreyle ısıtılmıştır. Bütün reaksiyonlar iki kez tekrar edilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin tespitini kolaylaştırmak amacıyla, model sistemlerde fındığın kavrulması sırasında uygulanan sıcaklığın (140-160 °C) üzerine (180 °C) çıkılmıştır.

3.4. Kavrulmuş Fındık Örneklerinin Hazırlanması

Kabuklu fındıklar analiz öncesi kabuklarından ayrılmış ve fırında (Memmert, Almanya) 160 °C'de 10, 30 ve 60 dakika kavurulmuştur. Paralelli olarak kavru lan fındık örnekleri analiz edilinceye kadar -18°C'de saklanmıştır.

3.5. Lipit Oksidasyon Ürünlerinin Analizi

Okside edilen fındık yağı soğutulduktan sonra 0,5 g yağ örneği tartılmıştır. Örnek üzerine 1 mL metanol-su (70-30) karışımı ilave edilip 2 dakika vortekslenmiştir. 8000 rpm hızda 5 dakika santrifüj işleminin ardından süpernatant ayrılmıştır. Ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra süpernatantlar birleştirilmiş ve 8000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ekstrakt, naylon filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialerle aktarılmıştır.

Lipit oksidasyon ürünlerinin analizinde Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi - Yüksek Ayırma Gücünde Kütle Spektrometresi sistemi (UHPLC/Exactive Orbitrap MS) (Thermo Fisher Scientific-San Jose, CA, USA) kullanılmıştır. Daha önce Kocadağlı ve arkadaşları tarafından belirtilen metot (Kocadağlı et al., 2012) bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

Kromatografik ayırım, Hypersil Gold kolonu (100 mm x 2,1 mm x 1,9 µm) ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril (A) ve suda (B) hazırlanan % 0,1'lik (v/v) formik asit çözeltilerinin gradyan karışımları, 200 µL/dak akış hızında sistemden geçirilmiştir. Gradyan karışım için uygulanan elüsyon programı şu şekildedir:

Akış % 90 A ve % 10 B çözeltisi ile başlatılmıştır. A çözeltisinin mobil faz içerisindeki oranı ilk 5 dakika içerisinde % 90' dan % 20' ye düşürülmüş sonraki 2 dakika için sabit tutulmuş ve son 5 dakikada % 90' a çıkarılmıştır.

Kütle spektrometresinde elektrosprey iyonlaştırma kaynağı (ESI) kullanılmış ve hem negatif hem de pozitif modda çalışılmıştır. İyonlaştırma kaynağına ait bazı parametreler şu şekildedir: Sheath gaz akış hızı: 45 (arbitrary units), auxiliary gaz akış hızı: 20 (arbitrary units), sprej voltajı: 4 kV, kapiler voltajı: 20 V, lens tüpü voltajı: 30 V, soğutucu voltajı: 15 V, kapiler sıcaklığı: 350 °C, buharlaştırıcı sıcaklığı: 350 °C.

Ayırma gücü 100 000, data alım hızı 1 Hz, otomatik artış kontrol hedefi 1×10^6 , maksimum enjeksiyon süresi 50 ms olarak ayarlanmıştır. 50-400 m/z oranına sahip iyonlar taranmıştır.

3.6. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonu Ürünlerinin Analizi

3.6.1. Model reaksiyon sistemlerinde reaksiyon ürünlerinin ekstraksiyonu

Soğutulan reaksiyon tüplerine 5 mL metanol-su (70:30) karışımı ilave edilmiş ve 3 dakika vortekslenmiştir. Ekstraktlar eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra 8000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant naylon filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialerine aktarılmıştır. Bu ekstraksiyon sonucunda, model sistemlerdeki amino asit değişimi de belirlenmiştir.

3.6.2. Fındıkta reaksiyon ürünlerinin ekstraksiyonu

160 °C' de 30 ve 60 dakika kavru lan fındık örnekleri öğütülmüştür. 1 g öğütülmüş fındık örneği tartılarak üzerine 4,5 mL metanol-su (70:30, v/v) ve 0,25 mL Carrez I-0,25 mL Carrez II ilave edilmiştir. Karışım 3 dakika vortekslenmiş ardından 7000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant ayrılmıştır. Pelet üzerine yalnızca 2,5 mL metanol-su (70:30, v/v) ilave edilerek ekstraksiyon işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Birleştirilen süpernatantlar 8000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ekstrakt, naylon filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialerine aktarılmıştır.

3.6.3. LC-HRMS analizi

E.O.E. reaksiyonu ürünlerinin analizinde, Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi - Yüksek Ayırma Gücünde Kütle Spektrometresi sistemi (UHPLC/Exactive Orbitrap MS) (Thermo Fisher Scientific-San Jose, CA, USA) kullanılmıştır.

Kromatografik ayırım, Atlantis T3 kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak su (A) ve metanolde (B) hazırlanan % 0,1'lik (v/v) formik asit çözeltilerinin gradyan karışımları 500 µL/dak akış hızında sistemden geçirilmiştir. Gradyan karışım için uygulanan elüsyon programı şu şekildedir:

Çizelge 3.1. E.O.E. ürünlerinin analizinde uygulanan elüsyon programı

Süre	%A	%B
0	70	30
5	70	30
10	5	95
15	5	95
20	70	30
25	70	30

Kütle spektrometresinde, lipit oksidasyon ürünlerinin analizinde yapılan düzenlemeler kullanılmıştır.

3.7. Serbest Amino Asit Analizi

Öğütülmüş fındık örneklerinden (ham ve farklı sürelerde kavrulmuş) 1 g tartılmıştır. Ekstraksiyon, 20 mL su ile 3 kademede (10-5-5 mL) gerçekleştirilmiştir. Her kademede, su ilavesinin ardından 3 dakika vorteksleme ve 7500 rpm hızda 5 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon sonunda toplanan süpernatantlar bulanık nitelikte olduğundan dondurulup çözüldükten sonra tekrar aynı hız ve sürede santrifüj edilmiştir. Ekstrakt, naylon filtreden (0,45 µm) geçirilmiştir. 100 µL berrak ekstrakt vialle aktarıldıktan sonra 500 µL asetonitril ve 400 µL deiyonize su ile seyreltilmiştir.

Serbest amino asit analizi, ultra yüksek basınç sıvı kromatografisi - yüksek ayırma gücünde kütle spektrometresi sistemi (UHPLC-Exactive Orbitrap, Thermo Scientific) ile yapılmıştır. Analiz için Gökmen et al. (2012) tarafından belirtilen metot kullanılmıştır. Kromatografik ayırımlar Atlantis HILIC silika (150 × 2.1 mm, 3 µm) (Waters-Milford, MA, USA) kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril (A) ve suda hazırlanan % 0,1'lik (v/v) formik asit çözeltisi (B) kullanılmıştır. Mobil faz için akış hızı 400 µL/dak, sıcaklık 30 °C olarak ayarlanmıştır. Asetonitrilin (A) mobil faz içerisindeki oranı ilk 4 dakika % 75' den % 50' ye düşürülmüş sonraki iki dakikada tekrar % 75' e çıkarılmıştır.

Kütle spektrometresinde iyonlaştırma kaynağı olarak elektrosprey kullanılmış ve pozitif modda çalışılmıştır. İyonlaştırma kaynağına ilişkin bazı parametreler şu şekildedir: Sheath gaz akış hızı: 35, auxiliary gaz akış hızı: 35, sprej voltajı: 3,5 kV, kapiler voltajı: 25 V, kapiler sıcaklığı: 280 °C.

m/z oranı 60 ve 220 arasında olan iyonlar taranmıştır. Ayırma gücü 50 000, otomatik artış kontrol hedefi yüksek dinamik aralık, maksimum enjeksiyon süresi 100 ms olarak ayarlanmıştır.

3.8. Furosin Analizi

0,5 g öğütülmüş fındık örneği (ham ve farklı sürelerde kavrulmuş) cam tüpe aktarılmış ve üzerine 10 mL 8 N HCl ilave edilmiştir. Cam tüplerin içerisine 2 dakika boyunca N₂ gazı tutulmuş sonrasında kapakları kapatılmış ve etüvde, 110 °C' de 23 saat hidroliz edilmiştir. Hidrolizat kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra deiyonize suyla 10 kat seyreltilmiş ve 1 mL'si önceden koşullandırılmış Oasis HLB kartuştan geçirilmiştir. İlk 8 damladan sonraki damlalar viale aktarılmıştır. Kartuş koşullandırması için 1 mL metanol, 1 mL su ve hava kartuştan geçirilmiştir.

Analiz, otomatik örnek enjeksiyon sistemi, kuaterner pompa, sıcaklık kontrollü kolon ve diyot dizini detektörden (DAD, Diode Array Detector) oluşan bir yüksek basınç sıvı kromatografi sisteminde (Agilent Technologies - 1100 HPLC System-Waldbronn, Almanya), Gökmen et al. (2009) tarafından belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için Atlantis HILIC kolon (150 × 2.1 mm, 3 µ m) (Waters-Milford, MA, USA) kullanılmıştır. Mobil faz akışı, 40 ° C' de, 1 mL/dak hızında % 1'lik formik asit çözeltisi ile sağlanmıştır. Dedeksiyon 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analiz için furosin standardından hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

3.9. HMF Analizi

1 g öğütülmüş fındık (ham ve farklı sürelerde kavrulmuş) tartıldıktan sonra üzerine 9 mL deiyonize su ve 0,5 mL Carrez I, 0,5 mL Carrez II ilave edilmiştir. 3 dakikalık vorteksleme işleminin ardından 7000 rpm hızda 5 dakika santrifüjleme yapılmıştır.

Süpernatant ayrılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 5 mL su ile iki kez daha tekrar edilmiştir. Toplanan süpernatantlardaki yağın uzaklaştırılması ve bulanıklığın giderilmesi amacıyla 4 °C'de 7000 rpm'de 5 dakika boyunca soğuk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Ekstrakt, naylon filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialerle aktarılmıştır.

HMF ölçümü, yüksek basınç sıvı kromatografi sisteminde (Agilent Technologies, 1100-HPLC System- Waldbronn, Almanya) DAD kullanılarak ve daha önce Kocadağlı et al. (2012) tarafından belirtilen metotta bazı değişikliklerin uygulanması ile yapılmıştır. Kromatografik ayırım için Atlantis dC18 kolon (5 µm, 4.6 mm, 250 mm) (Waters-Milford, MA, USA) kullanılmıştır. Mobil faz akışı, 25 °C'de, 1 mL/dak hızında 10 mM formik asit - asetonitril (90:10, v/v) izokratik karışımı ile sağlanmıştır. Dedeksiyon 285 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için HMF stok çözeltisi 1.0 mg/mL derişimde su içerisinde hazırlanmıştır. Standart çözeltiler, stok çözeltilerden günlük olarak 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL derişimlerine deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.10. Şeker Analizi

2 g öğütülmüş fındık örneği (ham ve farklı sürelerde kavrulmuş) üzerine 4,5 mL su, 0,25 mL Carrez I ve 0,25 mL Carrez II ilave edilmiştir. 3 dakikalık vorteksleme işleminin ardından 8000 rpm hızda 5 dakika santrifüjleme yapılmıştır. Süpernatant ayrılarak ekstraksiyon işlemi 5 mL su ile bir kez daha tekrar edilmiştir. Toplanan süpernatantlardaki yağın uzaklaştırılması ve bulanıklığın giderilmesi amacıyla soğuk santrifüjleme ve dondurma-çözme işlemi (4 °C - 8000 rpm - 5 dakika) yapılmıştır. Ekstrakt, naylon filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialerle aktarılmıştır.

Analiz yüksek basınç sıvı kromatografi sisteminde (Agilent Technologies, 1100-HPLC System- Waldbronn, Almanya) refraktif indeks dedektör (RID) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 5 µL olarak ayarlanmıştır. Kromatografik ayırım için Shodex RSpak KC-811 kolon (7 µm, 8 x 300 mm) kullanılmıştır. Mobil faz akışı, 40 °C kolon sıcaklığında, 1,2 mL/dak hızında % 0,1'lik H₃PO₄ çözeltisi ile sağlanmıştır.

Kantitatif tayin için 1000, 500, 250, 100 µg/mL konsantrasyonlarında glukoz ve fruktoz standart çözeltileri hazırlanmıştır.

3.11. İstatiksel Analizler

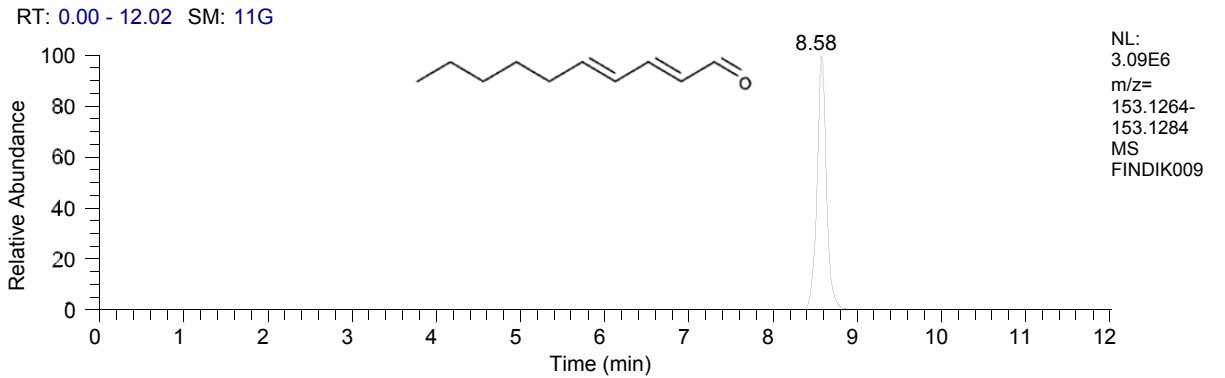
Tekrarlanan deney sonuçlarına ilişkin ortalama \pm standart sapma değerleri ve grup çiftleri arasındaki istatiksel anlamlı farklılığı araştırmak için Microsoft Excel 2010 programı kullanılmıştır. Gerçekleştirilen t-testi sonucunda $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Fındık Yağının Isıtılması ile Lipit Oksidasyon Ürünlerinin Oluşumu

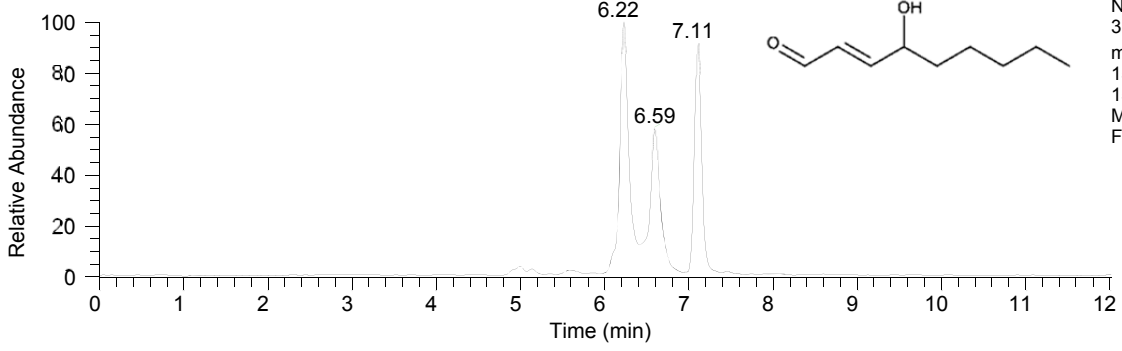
Gıdalarda lipit-protein interaksiyonlarına dair ilk bulgular geçmiş yıllarda farklı bilim insanları tarafından rapor edilmiştir (Lea et al. 1958-1960; Carpenter et al. 1962; Tooley and Lawrie 1974). Tooley ve Lawrie'nin yapmış olduğu çalışmada balık filetolarını kızartmak için kullanılan yağın termal oksidasyon durumunun lisin kaybında etkili olduğu ve okside yağ kullanıldığında lisin kaybının % 10 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yakın tarihte de lipit oksidasyon ürünlerinin amino asitlerle olan reaksiyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalarda daha çok model sistemler tercih edilmiş ve karbonil kaynağı olarak primer lipit oksidasyon ürünü olan hidroperoksitler, sekonder oksidasyon ürünleri (4,5 epoksi-2-alkenal, 2,4-dekadienal, 4-Hidroksinonenal) epoksiketo yağ asidi esterleri kullanılmıştır.

Fındık yağının 150 °C'de 6 saat ısıtılması sonucunda oluşan lipit oksidasyon ürünleri LC-HRMS'de pozitif ve negatif iyonizasyon modunda taranmıştır. Analiz sonuçlarına göre oktanal, 2-oktenal, 4-hidroksinonenal, 4-okzo-2-nonenal, 2-dekenal, 2,4-dekadienal, nonandioik asit, oktandioik asit gibi tespit edilen lipit oksidasyon ürünleri içerisinde en yüksek seviyede oluşanlar 2,4-dekadienal, 4-hidroksinonenal, nonandioik asit ve oktandioik asittir. Bu ürünlere ait kromatogramlar Şekil 4.1. Şekil 4.2. Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



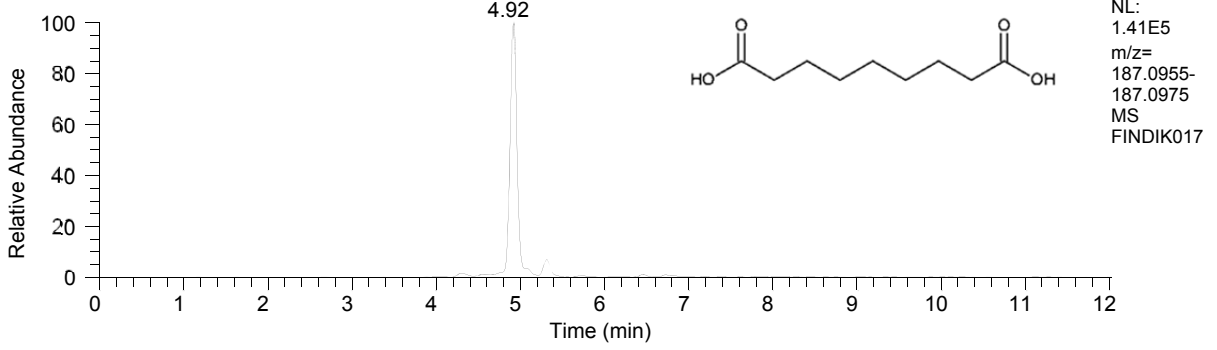
Şekil 4.1. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan 2,4-dekadienal kromatogramı

RT: 0.00 - 12.02 SM: 11G



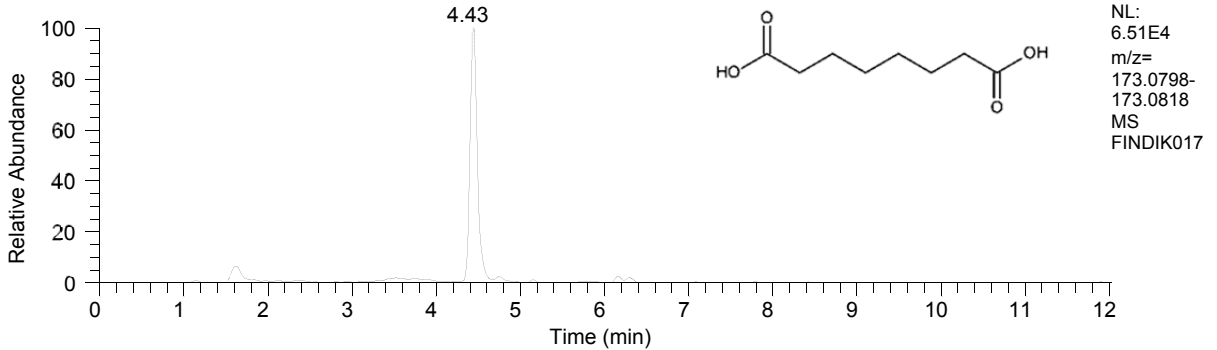
Şekil 4.2. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan 4-Hidroksi-2-nonenal kromatogramı

RT: 0.00 - 12.02 SM: 11G



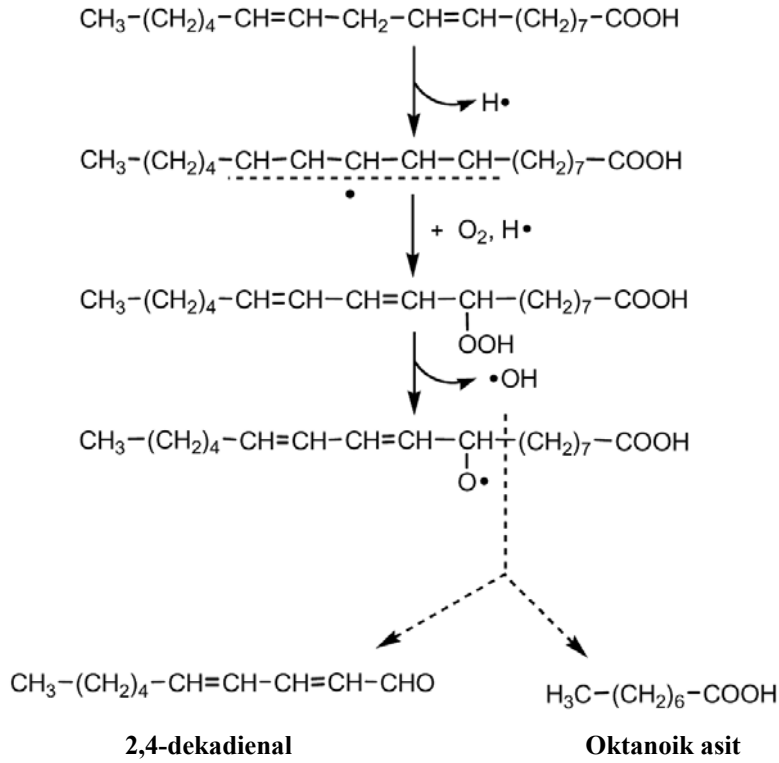
Şekil 4.3. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan nonandioik asit kromatogramı

RT: 0.00 - 12.02 SM: 11G

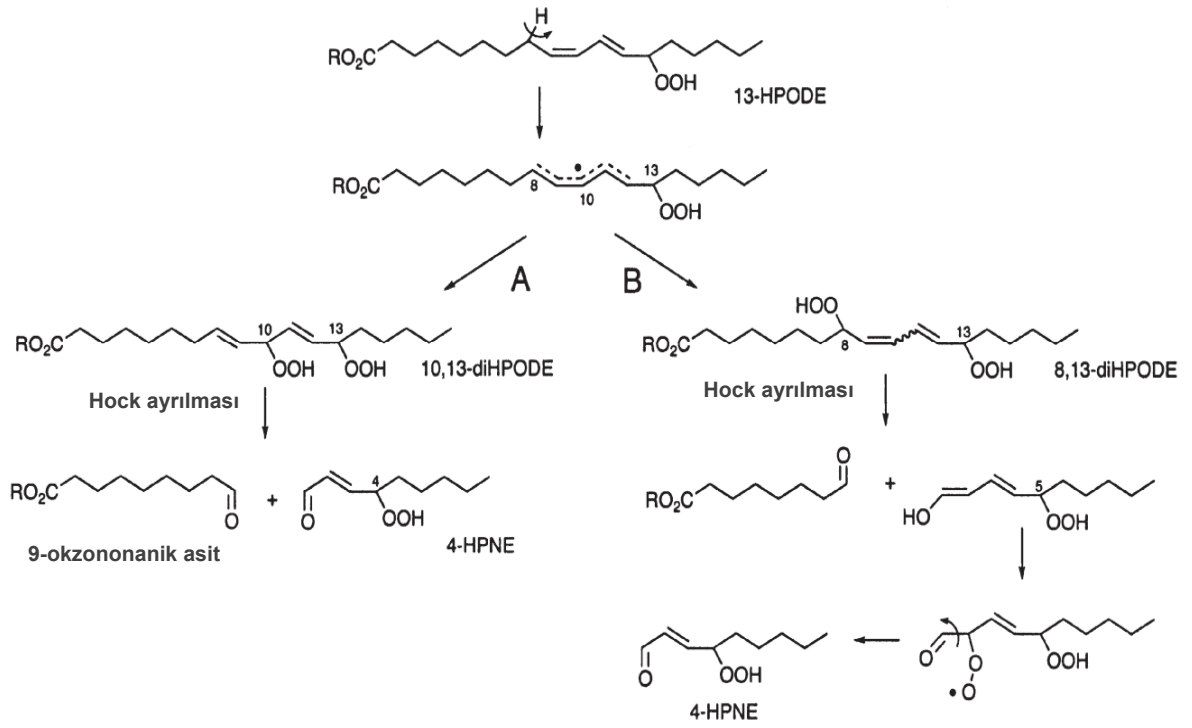


Şekil 4.4. 150 °C'de 6 saat ısıtma sonucu fındık yağında oluşan oktandioik asit kromatogramı

Yapılan deneylerde, sahip oldukları karbonil gruplarının reaktivitesinden dolayı 2,4-dekadienal ve 4-hidroksinonenal değişiminin izlenmesine karar verilmiştir. 2,4-dekadienal ve 4-hidroksinonenalin linoleik asidin oksidasyonu sırasında oluşumu sırasıyla Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



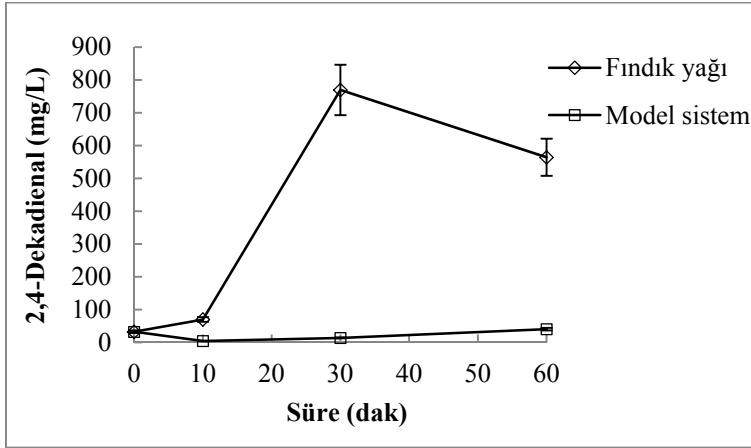
Şekil 4.5. Linoleik asidin oksidasyonu sırasında 2,4-dekadienal oluşumu (Choe and Min, 2007)



Şekil 4.6. Linoleik asidin oksidasyonu sırasında 4-Hidroksiperoкси-2-nonenal oluşumu (Schneider et al., 2008)

4.2. Model Sistemlerin Isıtılması Sırasında Meydana Gelen Kimyasal Değişmeler

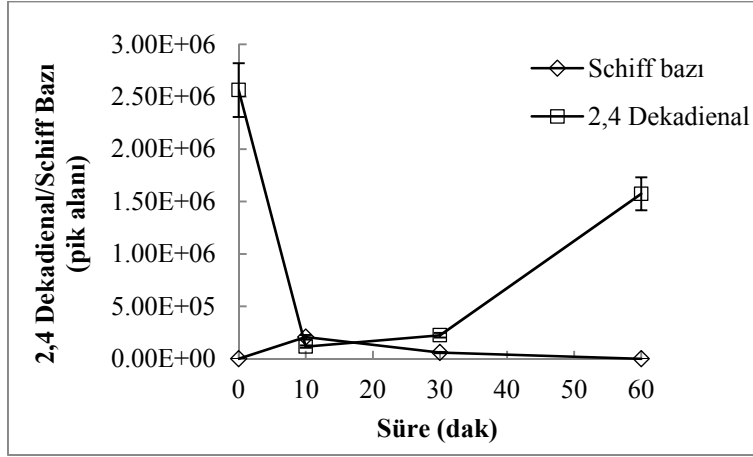
Lipit oksidasyon ürünü olan 2,4-dekadienalın amino asitlerle olan reaksiyonunu izlemek üzere 180 °C' de 10, 30, 60 dakikalık ısıtma sonucunda model sistem (10 µmol lisin- önceden 180 °C' de 3 saat ısıtılan fındık yağı-100 µL) ve fındık yağında (180 °C' de 3 saat ısıtılmış, 100 µL) belirlenen 2,4-dekadienal miktarı (µg/L) Şekil 4.7.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve fındık yağında oluşan 2,4 dekadienal miktarı

Bu sonuçlara göre 2,4-dekadienal miktarı ilk 10 dakikada model sistemde azalmış, fındık yağında ise önemli bir değişiklik göstermemiştir. 2,4-dekadienal dien yapısı nedeniyle oksidasyon eğilimine sahip bir moleküldür. İlk 10 dakika için fındık yağında birbirine yakın seviyelerde 2,4-dekadienalın üretilmesi ve okside/dekompoze olması, model sistemde ise fındık yağında görülen duruma ilave olarak 2,4-dekadienalın lisin ile reaksiyona girmesi ile sonuçları açıklamak mümkündür. Fındık yağı ısıtmaya devam edildiğinde 2,4-dekadienal miktarı, 30. dakikada maksimum seviyeye (769 mg/L) çıkmakta ve sonrasında azalmaktadır. Fındık yağında, 10 ve 30. dakika aralığı için 2,4-dekadienal oluşum oranının daha fazla, 30 ve 60. dakika aralığı için ise oksidasyon ve dekompozisyon oranının daha fazla olduğu söylenebilir. Model sistemde 10. dakikadan sonra 2,4-dekadienal miktarında düşük seviyede bir artış gözlenmektedir. Model sistem ve fındık yağı verileri birlikte değerlendirildiğinde 10-30. dakikalar arasında, lisin ve 2,4-dekadienal arasındaki reaksiyon oranında artış olduğu düşünülebilir.

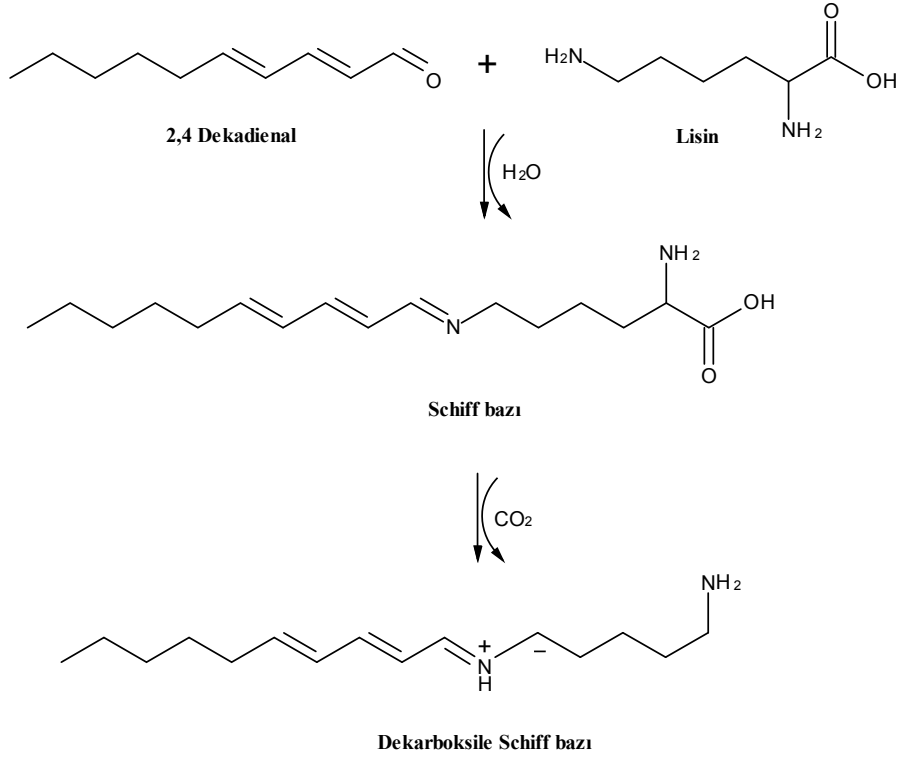
Şekil 4.8.' de 180 °C'de 10, 30, 60 dakikalık ısıtma sonucunda model sistemde (10 µmol lisin-önceden 180 °C'de 3 saat ısıtılan fındık yağı-100 µL) belirlenen 2,4-dekadienal ve Schiff bazı miktarı pik alanı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistemde oluşan 2,4-dekadienal ve Schiff bazı miktarı

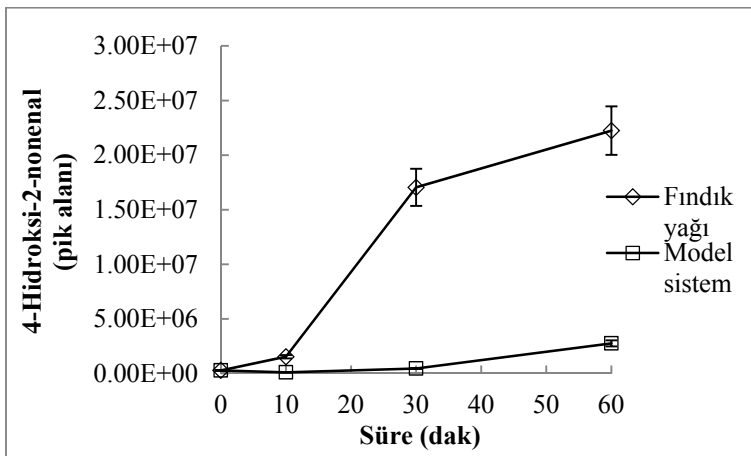
2,4-dekadienal ve lisinin reaksiyonu sonucu Schiff bazı ve dekarboksile Schiff bazı formunun oluşumu Şekil 4.9.'da verilmiştir. Şekil 4.8.'e göre Schiff bazı miktarı ilk 10 dakika içerisinde artmış ve daha sonra azalmıştır. Schiff bazı oluşumunun en yüksek olduğu 10. dakikada 2,4-dekadienal miktarındaki düşüş dikkat çekmektedir. İlk 10 dakika içerisinde sadece fındık yağı içeren sistemin 2,4-dekadienal miktarında önemli bir değişiklik olmadığı (Şekil 4.7); 2,4-dekadienal oksidasyonu ve herhangi bir parçalanma reaksiyonunun, oluşum oranına yakın seviyede gerçekleştiği dikkate alınırsa bu düşüşün Schiff bazına dönüşüm sonucunda meydana geldiği görülmektedir.

2,4-dekadienalın karbonil grubu ile lisinin nükleofilik amino grubunun birleşmesi sonucu oluşan Schiff bazı kısmi stabil özellikte olduğundan reaksiyonun devam etmesi ile diğer ürünlere dönüştüğü bilinmektedir (Şekil 4.17.). 10. dakikadan sonra Schiff bazının diğer ürünlere dönüşüm oranının, oluşum oranından daha fazla olduğu söylenebilir.



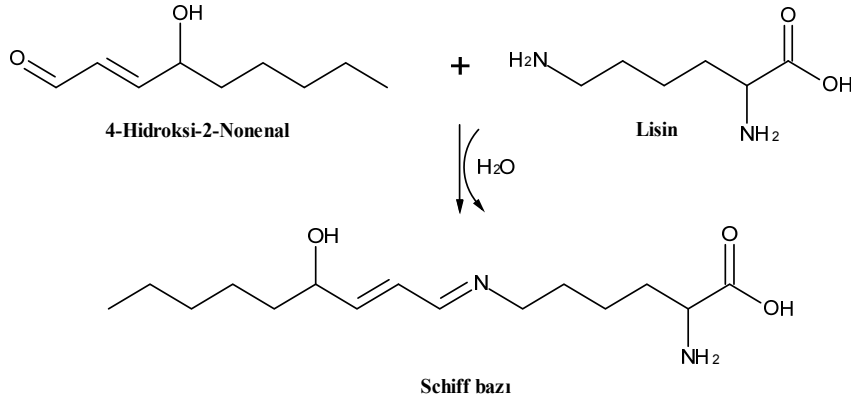
Şekil 4.9. 2,4 dekadienalin lizinle reaksiyonu sonucu Schiff bazı ve dekarboksile formunun oluşumu

Şekil 4.10.'da 180 °C'de 10, 30, 60 dakikalık ısıtma sonucunda model sistem (10 µmol lizin- önceden 180 °C'de 3 saat ısıtılan fındık yağı-100 µL) ve fındık yağında (180 °C' de 3 saat ısıtılmış, 100 µL) belirlenen 4-Hidroksi-2-nonenal miktarı pik alanı olarak gösterilmiştir.



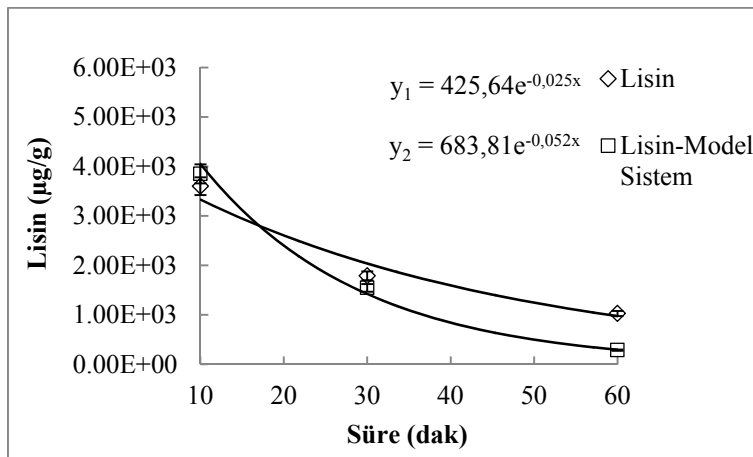
Şekil 4.10. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve fındık yağında oluşan 4-Hidroksi-2-nonenal miktarı

Isıtma süresince hem fındık yağında hem de model sistemde 4-Hidroksi-2-nonenal miktarı artmıştır. 2,4-dekadienale benzer şekilde 4-Hidroksi-2-nonenal model sistemde lizin ile reaksiyona girdiğinden daha az seviyede tespit edilmiştir. Reaksiyon mekanizması Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. 4-Hidroksi-2-nonenalin lizinle reaksiyonu sonucu Schiff bazı oluşumu

Şekil 4.12.' de 180 °C'de 10, 30, 60 dakikalık ısıtma sonucunda model sistem (10 µmol lizin-önceden 180 °C'de 3 saat ısıtılan fındık yağı-100 µL) ve sadece lizin içeren sistemde (10 µmol) tespit edilen lizin miktarı gösterilmiştir.

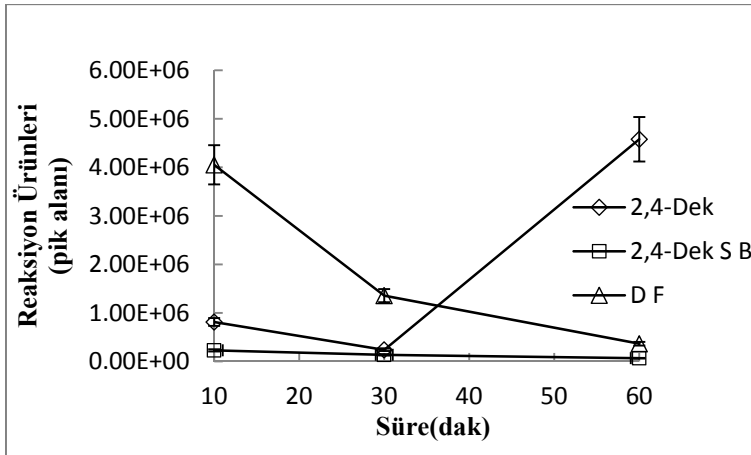


Şekil 4.12. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu model sistem ve sadece lizin içeren sistemde, lizin miktarında meydana gelen değişim

Amino asitlerin termal dekompozisyonu sonucu düşük molekül ağırlıklı, uçucu bileşikler (aminler, amidler, nitriller, aldehitler, ketonlar, doymuş ve doymamış hidrokarbonlar) ve daha yüksek molekül ağırlığında dipeptitler, siklik dipeptitler (piperazin-2,5-dion) oluşmaktadır (Wanjun et al., 2006). Yapılan bir çalışmada lisinin 250 °C'de 1 saat ısıtılması sonucu piridin, pirol, piperidin, laktam, amid ve amin gibi farklı bileşiklerden oluşan lisin pirolizati oluştuğu tespit edilmiştir (Nawar and Breitbart, 1979). Sadece lisin içeren sistem ısıtıldığında termal dekompozisyon sonucu farklı bileşikler oluşarak lisin miktarında azalma görülmüştür.

Sadece lisin içeren sistem (k_1-r_{01}) ve model sisteme (k_2-r_{02}) ait hız sabiti ve başlangıç reaksiyon oranları sırasıyla k_1 : 0,025, r_{01} :10,13, k_2 : 0,052, r_{02} :18,3 olarak hesaplanmıştır. İki sisteme ait hız sabitleri ve başlangıç reaksiyon oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Reaksiyon oranı ve hız sabiti değerleri dikkate alındığında lisin kaybının, model sistemde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla oranda gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuç lipit oksidasyon ürünlerinin amino asitlerle olan etkileşimini doğrulamaktadır.

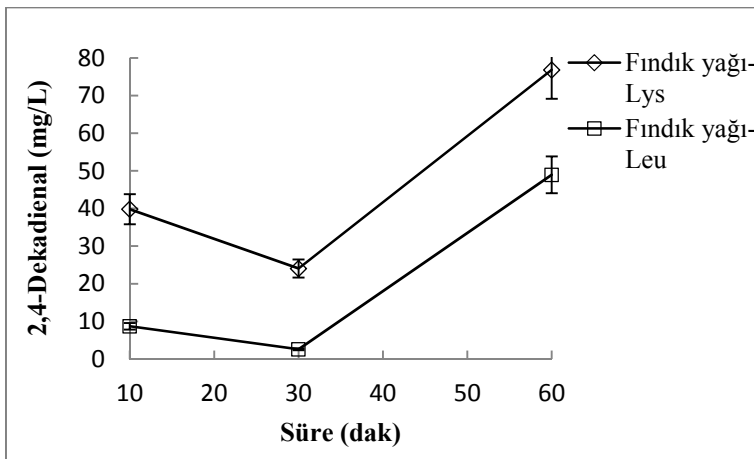
Şekil 4.13.'de önceden 180 °C'de 3 saat okside edilen 1 mL fındık yağı ve 10 µmol lösin içeren model sistemde, 2,4-dekadienal, Schiff bazı ve dekarboksile formunun 180 °C'de ısıtma süresince değişimi gösterilmiştir.



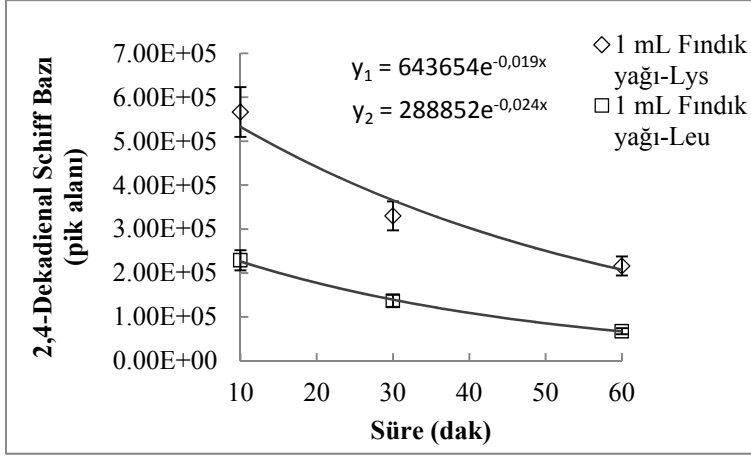
Şekil 4.13. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı ve lösin içeren sistemde, 2,4 dekadienal (2,4-Dek), Schiff bazı (2,4-Dek SB) ve dekarboksile formunun (DF) oluşumu

Model sistemde amino grubu kaynağı olarak lisine göre daha hidrofobik yapıda olan lösin kullanıldığında, 10. dakikada önemli miktarda Schiff bazının dekarboksile formu ve düşük miktarda Schiff bazı tespit edilmiştir. Lisinin yan zincirinde bulunan amino grubu kısmen daha hidrofobik bölgede olduğu için lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyona girme olasılığı artmaktadır. Lösin yan zincirinde amino grubu yoktur ve reaksiyonun α -karbonuna bağlı amino grubu ile gerçekleşmesi CO_2 ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle lösin içeren sistemde önemli miktarda dekarboksile Schiff bazı tespit edilirken lisin içeren sistemde bu duruma rastlanmamaktadır. 2,4-dekadienal miktarı 10-30. dakikalar arasında azalırken 30. dakikadan sonra artmıştır. Dekarboksile form miktarının ısıtma süresince düşmesi oluşum oranının diğer reaksiyon ürünlerine dönüşüm oranından daha düşük olduğunu göstermektedir. 30. dakikadan sonra elde edilen analiz verileri birlikte değerlendirildiğinde özellikle 2,4-dekadienalin artış göstermesi ve dekarboksile formun oldukça azalması reaksiyon oranının önemli ölçüde düştüğünü göstermektedir.

Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'te $180\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10, 30, 60 dakikalık ısıtma sonucunda sırasıyla iki farklı amino asit içeren model sistemde ($10\ \mu\text{mol}$ lisin/lösin - önceden $180\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 saat ısıtılan fındık yağı-1 mL) belirlenen 2,4-dekadienal ($\mu\text{g/g}$) ve Schiff bazı (pik alanı) miktarı gösterilmiştir.



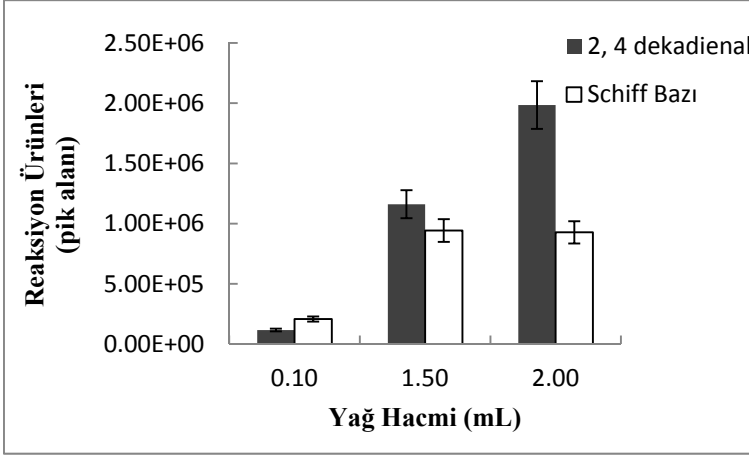
Şekil 4.14. $180\text{ }^\circ\text{C}$ 'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı ve lisin ya da lösin içeren sistemlerde, 2,4 dekadienal oluşumu



Şekil 4.15. 180 °C'de farklı sürelerde ısıtma sonucu 1 mL fındık yağı-lisin ya da lösin içeren sistemlerde, 2,4 dekadienal Schiff bazı oluşumu

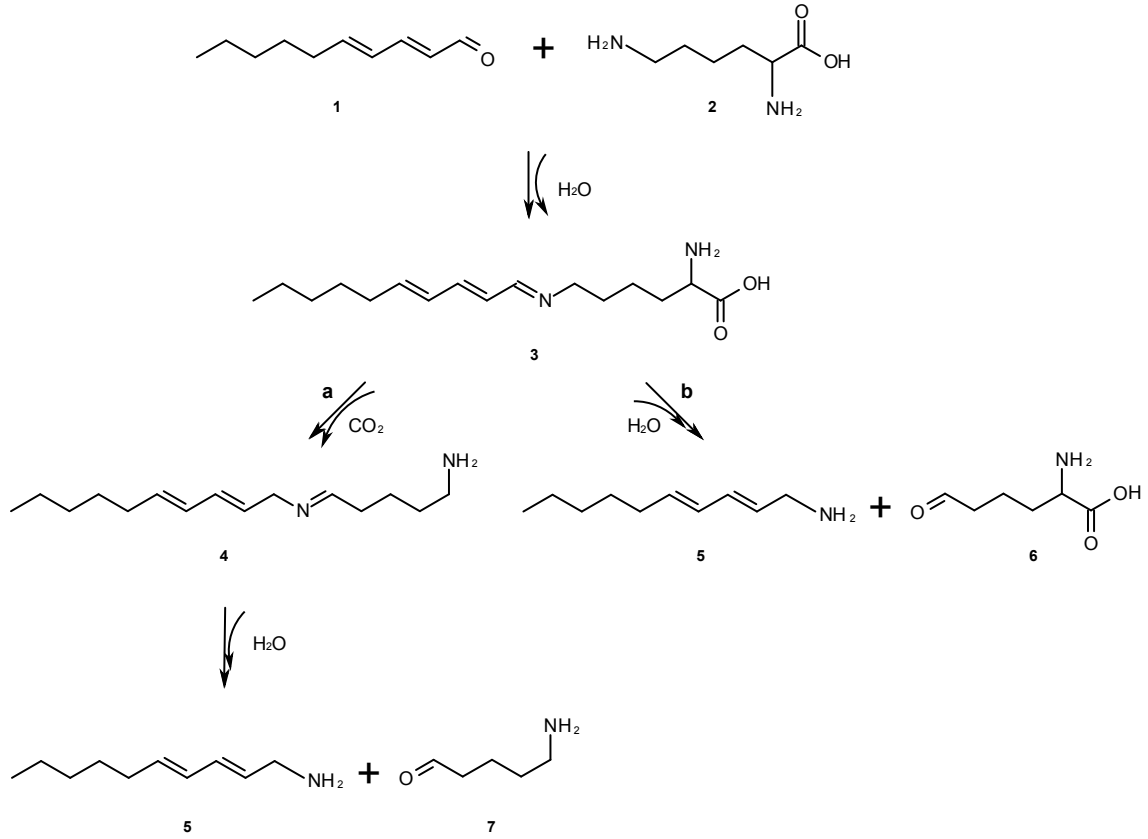
Her iki sistemde de 2,4-dekadienal miktarı 10 ve 30. dakikalar arasında azalmış 30. dakikadan sonra artmıştır. Schiff bazı miktarı, iki sistem için de ısıtma süresince düşmüştür. Aynı miktarda yağ içeren sistemlerde, E.O.E. reaktantı olan 2,4-dekadienalın lösin içeren sistemde reaksiyon süresince daha düşük miktarda tespit edilmesi reaksiyon oranının lösin içeren sistemde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Lösinin lisine göre oldukça hidrofobik olması amino grubunun, yağ ortamında oluşan karbonil kaynağı ile karşılaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bu durumun, reaksiyon oranının artmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Yağ miktarının reaksiyona etkisini belirlemek üzere önceden 180 °C'de 3 saat ısıtılan fındık yağı (0,1-1,5-2 mL) ve 10 µmol lisin içeren sistemlerin, 180 °C'de 10 dakika ısıtılması sonucu belirlenen 2,4-dekadienal ve Schiff bazı miktarı Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. 180 °C'de 10 dakika ısıtma sonucu 0,1, 1,5 ya da 2 mL fındık yağı-lisin içeren sistemlerde, 2,4-dekadienal ve Schiff bazı oluşumu

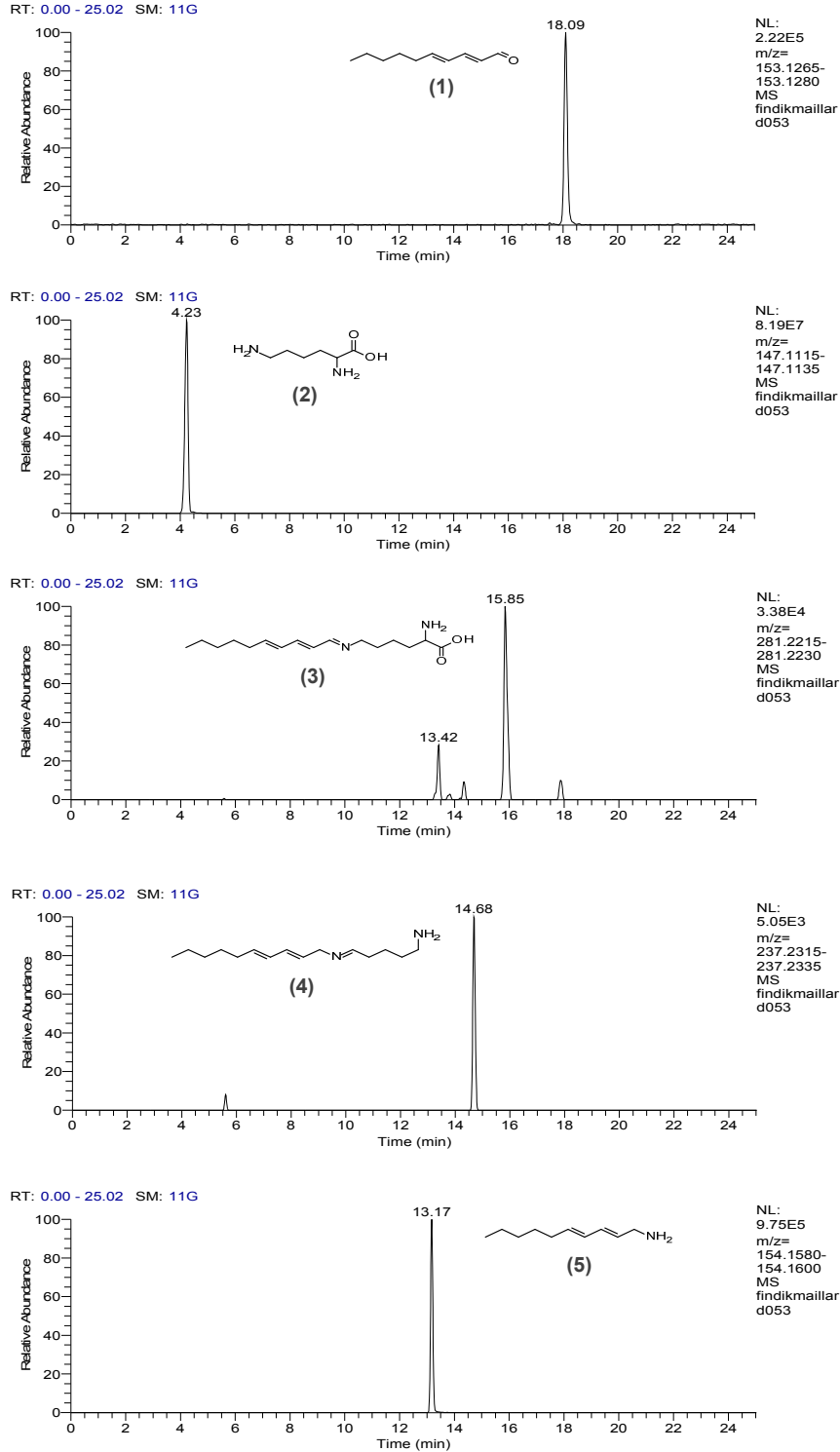
Yağ miktarının artmasıyla 2,4-dekadienal miktarı yağ miktarına bağlı olarak artmıştır. Reaksiyonun başlangıç ürünü olan Schiff bazı miktarı, yağ miktarı 0,1 mL'den 1 mL'ye çıkarıldığında 4,5 kat artmış, 1 mL'den 1,5 mL'ye çıkarıldığında ise önemli bir değişiklik göstermemiştir. Lisin ve fındık yağından oluşan model sistemin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin reaksiyon üzerinde kısıtlayıcı etkisinin olduğu düşünülmektedir. Lipit oksidasyonu sonucu oluşan 2,4-dekadienal yağ ortamında birikmekte ve daha hidrofobik özellikte olan lisinin, hidrofobik yapının çevresindeki oksidasyon ürünleri ile buluşması veya hidrofobik bariyeri aşması halinde reaksiyon gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle belirli bir seviyeden sonra yağ hacmindeki artış oluşan Schiff bazı miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamaktadır.



Şekil 4.17. 2,4 dekadienal-lisin genel reaksiyon şeması

Şekil 4.17’de (1: 2,4-Dekadienal, 2: Lisin, 3: 2-amino-6-[(E)-[(2E,4E)-deka-2,4-dieniliden]amino] hekzanoik asit, 4: (5E)-5-[(2E,4E)-deka-2,4-dienil]iminopentan-1-amin, 5: (2E,4E)-deka-2,4-dien-1-amin, 6: 2-amino-6-okzo-hekzanoik asit, 7: 5-aminopentanal) daha önce Hidalgo ve Zamora tarafından önerilen mekanizma dikkate alınarak çizilen 2,4-dekadienal ve lisin arasında gerçekleşen reaksiyona ait genel şema verilmiştir (Hidalgo and Zamora, 2011). Bu mekanizmaya göre lisinin 2,4-dekadienalle birleşmesi sonucu bir molekül su ayrılarak Schiff bazı oluşmaktadır. Reaksiyon a yolu üzerinden devam ettiğinde önce dekarboksilasyon ve sonrasında hidrolitik parçalanma görülürken b yolu üzerinden devam ettiğinde ise Schiff bazı hidrolitik parçalanmaya uğramaktadır. 5 numaralı reaksiyon ürünü iki yol sonucunda da ortak olarak oluşmaktadır. Şekil 4.18.’de fındık yağı-lisin içeren model sistemlerin 180 °C’de 10 dakika ısıtılması sonucu ortamda belirlenen 1, 2, 3, 4, 5 (Şekil 4.17.) numaralı moleküllere ait kromatogramlar verilmiştir. Tespit edilen reaksiyon ürünleri arasında, herhangi bir amino aside özgü olmaması ve

bağlı olarak daha yüksek miktarda ($9,75E+05$) bulunması açısından deka-2,4-dien-1-amin (5) önem taşımaktadır.



Şekil 4.18. Fındık yağı ve lizin içeren model sistemlerin 180 °C'de 10 dakika ısıtılması sonucu belirlenen Şekil 4.17.'deki bileşiklere ait kromatogramlar

Farklı amino asitlerin reaksiyona etkisini belirlemek üzere okside fındık yağı (1 mL) - lizin, lösin, fenilalanin, serin (10 µmol) amino asitlerinden birini içeren sistemlerin 180 °C'de 10 dakika ısıtılması sonucu tespit edilen 2,4-dekadienal Schiff bazı ve dekarboksile formuna ait kimyasal yapı, bağıl miktar ve pozitif yüklü moleküler iyonların m/z değerleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

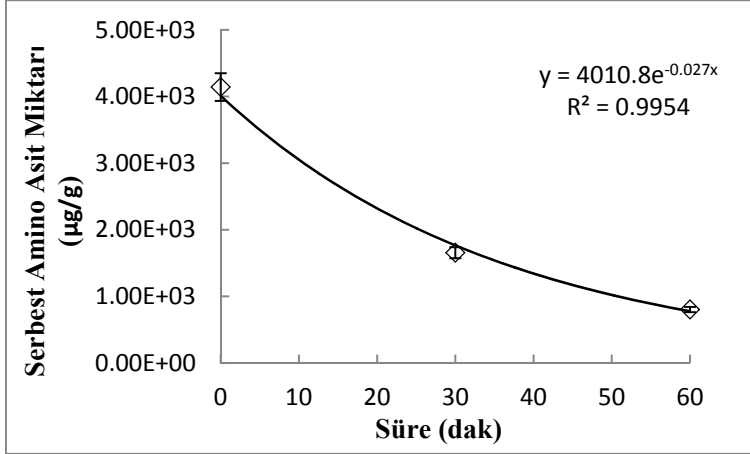
Çizelge 4.1. 180 °C'de 10 dakika ısıtma sonucu fındık yağı-lizin / lösin / fenilalanin / serin içeren sistemlerde, 2,4-Dek SB (3) ve DF (4) oluşumu

Amino asit	Bileşik	Kimyasal Yapı	m/z [M+H] ⁺	Δ [ppm]	Pik Alanı
Lys	3		281.2223	-1.00	1,10E+07
	4		237.2325	-1.58	2,8E+04
Leu	3		210.2216	-0.11	2,29E+05
	4		254.2114	-2.25	4,05E+06
Phe	3		300.1958	-0.95	5,38E+04
	4		256.2060	-0.54	1,12E+06
Ser	3		196.1695	-0.08	4,53E+04
	4		240.1594	0.97	5,93E+05

Lizin dışındaki amino asitler için tespit edilen dekarboksile form miktarının Schiff bazına göre daha fazla olduğu görülmektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi reaksiyonun amino asidin α-amino grubu ile gerçekleşmesinin Schiff bazından karbondioksit ayrılmasını kolaylaştırarak dekarboksile form oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.

4.3. Fındığın Kavrulması Sırasında Meydana Gelen Kimyasal Değişmeler

Serbest amino gruplarından dolayı E.O.E. reaksiyonlarında reaktif özellik gösterdiklerinden fındığın kavrulması ile serbest amino asit miktarında meydana gelen değişim incelenmiştir (Şekil 4.19.).

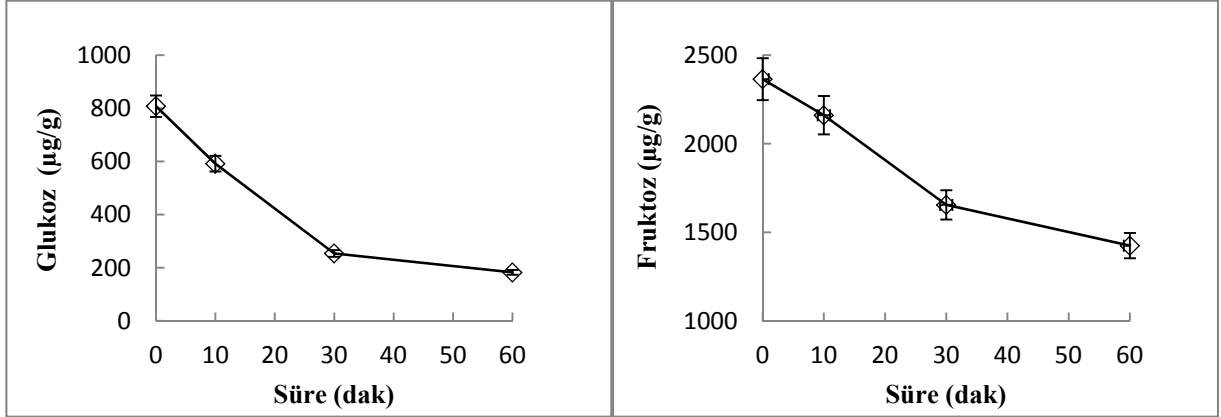


Şekil 4.19. Fındığın 160 °C'de 30 ve 60 dakika kavrulması sonucu toplam serbest amino asit miktarında meydana gelen değişim

Toplam serbest amino asit miktarında, 30 dakika sonunda yaklaşık % 60 oranında, 60 dakika sonunda ise % 81 oranında azalma meydana gelmiştir. Ayrıca 30 ve 60 dakikalık kavurma işleminin ardından 2,4-dekadienal konsantrasyonu sırasıyla 655 ± 65 ng/g ve 1089 ± 55 ng/g olarak belirlenmiştir.

Fındığın kavrulması sırasında termal dekompozisyon ve E.O.E. reaksiyonları sonucunda toplam serbest amino asit miktarı azalmaktadır. Amrein ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmaya göre 150 °C'de kavrulmuş fındıkta, 10 dakikadan sonra serbest amino asit içeriğinin % 80'inin, 18 dakikadan sonra ise % 50'sinin degrade olmadan kaldığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmaya göre indirgen şeker miktarında ilk 10 dakika içerisinde % 80'in üzerinde azalma tespit edilirken 18. dakikadan sonra başlangıç miktarının % 10' u kadar indirgen şeker kaldığı belirlenmiştir (Amrein et al., 2005). Bu sonuçlara göre serbest amino asit azalışında ilk 10 dakika içerisinde fındıkta sınırlı seviyede bulunan indirgen şekerlerin, bir başka ifadeyle Maillard reaksiyonunun, 10. dakikadan sonra ise daha çok lipid oksidasyon ürünleri ve termal dekompozisyonun etkili olduğu düşünülebilir.

Fındığın 160 °C'de 10, 30 ve 60 dakika kavrulması sonucu glukoz ve fruktoz miktarında meydana gelen değişim Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Fındığın 160 °C'de 10, 30 ve 60 dakika kavrulması sonucu glukoz ve fruktoz miktarında meydana gelen değişim

İlk 30 dakika içerisinde glukoz ve fruktoz miktarı sırasıyla % 69, % 30 oranında 60 dakika sonunda ise % 88, % 40 oranında azalmıştır. Bu azalmalarda dehidrasyon veya Maillard reaksiyonu ile HMF oluşumunun etkili olduğu söylenebilir.

Maillard reaksiyonu veya orta derecede asidik koşullarda heksozların dehidrasyonu ile karamelizasyon sırasında gıdalarda HMF oluştuğu bilinmektedir. Fındığın 160 °C'de kavrulması sırasında 30 ve 60. dakikada oluşan HMF miktarı, sırasıyla 8,7 µg g⁻¹ ve 29,3 µg g⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Şenyuva ve Gökmen tarafından fındığın 150 °C'de 30 dakika ısıtılması sonucunda 9,9 - 39,8 µg g⁻¹ konsantrasyon aralığında HMF oluştuğu belirtilmiştir (Şenyuva and Gökmen, 2007).

160 °C'de 30 ve 60 dakika kavurma işlemi sonrasında fındıkta Maillard reaksiyonu markörü olarak bilinen furosin (ε-N-(2-furosilmetil)-L-lisin) analizi yapılmıştır. Furosin proteine bağlı olarak bulunan lisinin ε amino grubu ve indirgen şekerlerin reaksiyonu sonucunda oluşarak Maillard reaksiyonunun başlangıç aşamasında oluşan Amadori bileşiğinin asidik koşullarda hidrolizi ile tespit edilmektedir. Analiz sonucunda 160 °C'de 30 ve 60 dakika kavrulan fındık örneklerinde furosin tespit edilmemiştir.

5. ÖNERİLER

E.O.E. reaksiyonları, gıda kalitesi ve güvenliğini önemli ölçüde etkilediklerinden karmaşık reaksiyon mekanizmalarını açıklamaya yönelik bilimsel çalışmalar geçmişten günümüze, sürdürülmeye devam etmektedir.

Maillard reaksiyonuna benzer olarak, doymamış yağ asidi içeriği yüksek lipitlerin oksidasyonu ile oluşan karbonil gruba sahip oksidasyon ürünleri ile amino grupları arasında E.O.E. reaksiyonları gerçekleşmektedir. Lipit ve protein oranı yüksek, özellikle fındık gibi tüketimi yaygın olan ve birçok gıda ürününün bileşiminde yer alan gıdalarda bu reaksiyonların kalitatif ve kantitatif analizi önem kazanmaktadır. Okside lipit-protein reaksiyonları ile ilgili çalışmalar daha çok model sistemler üzerinde gerçekleştirilmiş olup literatürde çoğunlukla kalitatif bulgulara rastlanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında fındık yağı ve amino asitten oluşan model sistem çalışmaları değerlendirildiğinde sistemin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin reaksiyon üzerinde negatif etki gösterdiği görülmüştür. Lipit oksidasyonu sonucu oluşan 2,4-dekadienal yağ ortamında birikmekte ve yağa göre kısmen daha hidrofilik özellik gösteren amino asitlerin hidrofobik ortamdaki oksidasyon ürünleri ile reaksiyona girmesi güçleşmektedir. Hidrofobik amino asit içeren sistemlerde E.O.E. reaktantı olan 2,4-dekadienal, ısıtma süresince daha düşük seviyede tespit edilmiştir. Ayrıca 180 °C'de gerçekleştirilen ısıtma sırasında 30. dakikadan sonra, ortamda yeterli miktarda reaktant bulunmasına rağmen reaksiyon oranının düşmesi, yağ hacminin artırılması sırasında belirli bir seviyeden sonra reaksiyon ürünlerinin miktarında önemli bir değişiklik görülmemesi model sistem özelliklerinin reaksiyonun ilerlemesini sınırlandırdığını göstermektedir. Yan zincirinde amino grubu olmayan amino asitlerde, dekarboksile Schiff bazı formu daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Reaksiyonun α -karbonuna bağlı amino grubu ile gerçekleşmesinin Schiff bazından CO₂ ayrılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

Fındığın kavrulması sırasında meydana gelen değişimler değerlendirildiğinde 160 °C'de 30 dakika sonucunda toplam serbest amino asit miktarında önemli ölçüde azalma ve HMF (8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$) oluşumu görülürken furosine oluşumuna rastlanmamıştır. Maillard reaksiyonu markörü olarak bilinen furosine fındığın

kavrulması sırasında gerekleŒen E.O.E. reaksiyonlarının kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi için uygun bir markör olmadığı gürmektedir.

Model sistemlerde oluŒtuęu tespit edilen 2,4-dekadienalin Schiff bazı veya dekarboksile formunun hidrolitik parçalanması sonucu oluŒan reaksiyon ürünleri, herhangi bir amino aside ya da herhangi bir lipit oksidasyon ürününe özgü olmadığı için reaksiyon ortamında daha fazla seviyede olmaları beklenmektedir. DoymamıŒ yağ asidi ve protein miktarı yüksek gıdalarda lipit oksidasyonunun rol aldığı E.O.E. reaksiyonlarının değerlendirilmesinde bu reaksiyon ürünlerinin kullanımı söz konusu olabilir.

Reaksiyon sırasında parçalanma ile oluŒan ve stabil özellik gösteren ürünler üzerinde daha kapsamlı araŒtırmaların yürütülmesi özellikle gıda sistemlerinde gerekleŒen bu reaksiyonun daha iyi anlaşılmasında ve kantitatif değerlendirmesinde faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Acott B. and Beckwith A. L. J., 1964, Reactions of alkoxy radicals. IV. Intramolecular hydrogen-atom transfer in the presence of cupric ion: A novel directive effect. *Austral. J. Chem.*, 17, 1342-1353.
- Adams A., Kitryt V., Venskutonis R., Kimpe N., 2011, Model Studies on the Pattern of Volatiles Generated in Mixtures of Amino Acids, Lipid-Oxidation-Derived Aldehydes, and Glucose. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1449-1456.
- Adams A., Kitryte V., Venskutonis R., Kimpe N., 2009, Formation and characterisation of melanoidin-like polycondensation products from amino acids and lipid oxidation products. *Food Chemistry*. 115, 904-911.
- Alasalvar C., Shahidi F., Liyanapathirana C., Ohshima T., 2003, Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional Characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3790-3796.
- Amrein T., Lukac H., Andres L., Perren R., Escher F., Amado R., 2005, Acrylamide in Roasted Almonds and Hazelnuts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7819-7825.
- Avila D. V., Ingold K. U., Kusztyk J., 1995, Dramatic Solvent Effects on the Absolute Rate Constants for Abstraction of the Hydroxylic Hydrogen Atom from tert-Butyl Hydroperoxide and Phenol by the Cumyloxy Radical. The Role of Hydrogen Bonding. *J. Amer. Chem. Soc.*, 117, 2929-2930.
- Baciocchi E., Bietti M., Salamone M., Steenken S., 2002, Spectral properties and absolute rate constants for β -scission of ring-substituted cumyloxy radicals. A laser flash photolysis study *J. Org. Chem.* 67, 2266-2270.
- Baignee A., Howard J. A., Scaiano J. C., Stewart L. C., 1983, Absolute Rate Constants for Reactions of Cumyloxy in Solution. *J. Amer. Chem. Soc.* 105, 6120-6123.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P., 2009, *Food Chemistry*. Springer, Germany. pp. 191-212; 270-285.
- Bolland J. L., 1949, Kinetics of olefin oxidation. *Quart. Rev.* 3, 1-21.
- Bors W., Erben-Russ M., Saran M., 1987, Fatty acid peroxy radicals: Their generation and reactivities *J. Electroanal. Chem.* 232, 37-49.
- Bors W., Tait D., Michel C., Saran M., Erben-Russ M., 1984, Reactions of alkoxy radicals in aqueous solutions. *Isr. J. Chem.*, 24, 17-24.
- Breitbart D. J. And Nawar W. W., 1981, Thermal Interaction of Lysine and Triglycerides. *J. Agric. Food Chem.* 29, 1194-1196.
- Breitbart D. J. And Nawar W. W., 1979, Thermal Decomposition of Lysine. *J. Agric. Food Chem.* 27, 511-514.

- Chan H. W. S., Prescott F. A. A., Swoboda P. A. T., 1976, Thermal Decomposition of Individual Positional Isomers of Methyl Linoleate Hydroperoxide: Evidence of Carbon–Oxygen Bond Scission. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 53, 572-576.
- Chio K. S., and Tappel A. L. 1969, Synthesis and Characterization of the Fluorescent Products Derived from Malonaldehyde and Amino Acids. *Biochemistry*, 8, 2821-2827.
- Choe E. and Min D.B., 2007, Chemistry of Deep-Fat Frying Oils, *Journal of Food Science*, 72, 77-86.
- Dix T. A. and Marnett L. J., 1981, Free radical epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by hematin and polyunsaturated fatty acid hydroperoxides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 103, 6744-6746.
- Eldin A. K., Marjukka M., Lampi A. M., 2003, The Challenging Contribution of Hydroperoxides to the Lipid Oxidation Mechanism. *Lipid Oxidation Pathways*. Eldin A. K. (ed.), AOCS Press, Sweden.
- El-Magoli S. B., Karel M., Yong S., 1980, Acceleration of lipid oxidation by volatile products of hydroperoxide decomposition *J. Food Biochemistry*. 3, 111-123.
- Erben-Russ M., Michael C., Bors W., Saran M., 1987, Absolute Rate Constants of Alkoxy Radical Reactions in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* 91, 2362-2365.
- Factor A., Russell C. A., Traylor T. G., 1965, Bimolecular combination reactions of oxy radicals. *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 3692-3696.
- Frankel E. N., Neff W. E., Selke E., Brooks D. D., 1988, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: X. Volatile thermal decomposition products of methyl linolenate dimers. *Lipids*. 23, 295-298.
- Frankel E.N., Garwood R.F., Khambay B.P., Moss G.P., Weedon B.C., 1984, Stereochemistry of Olefin and Fatty Acid Oxidation. Part 3. The Allylic Hydroperoxides from the Autoxidation of Methyl Oleate. *J. Chem. Soc.* 1, 2233-2240.
- Frankel E. N., Neff W. E., Selke E., Weisleder D., 1982, Photosensitized oxidation of methyl linoleate: Secondary and volatile thermal decomposition products. *Lipids*. 17, 11-18.
- Frankel E. N., 1980, Lipid Oxidation. *Prog. Lipid Res.* 19, 1-22.
- Frankel E. N., Neff W. E., Bessler T. R., 1979, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: V. Photosensitized oxidation. *Lipids*. 14, 961-967.
- Gardner H.W., 1989, Oxygen Radical Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 65-86.

- Gardner H. W., 1983, Xenobiotics in Foods and Feeds. Finley J. W. (ed.), American Chemical Society, USA. pp. 63-84.
- Gardner H. W., Kleiman, R., Weisleder, D., and Inglett, G. E., 1977, Cysteine Adds to Lipid Hydroperoxide. *Lipids*. 12, 655-660.
- Gardner H. W. and Weisleder D., 1976, Addition of N-acetylcysteine to linoleic acid hydroperoxide. *Lipids*. 11, 127-34.
- Gardner H. W., Eskins K., Grams G. W., Inglett G. R., 1972, Radical-Addition of Linoleic Hydroperoxides to Alpha-Tocopherol or Analogous Hydroxochromanlipids. 7, 324-34.
- Gilbert B. C., Marshall P. D. R., Norman R. O. C., Pineda N., Williams P. S., Electron spin resonance studies. Part 61. The generation and reactions of the *t*-butoxyl radical in aqueous solutions. *J. Chem. Soc.*, 1392-1400.
- Gillatt P.N., Rossell J.B. 1992. The interaction of oxidized lipids with proteins. Padley F.B. (ed.), *Advances in Applied Lipid Research*. JAI Press, Greenwich, Connecticut. pp. 65-118.
- Gökmen V., Serpen A., Ataç B., 2012, Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* DOI: 10.1007/s00216-012-5779-z
- Gökmen V., Serpen A., Morales F., 2009, Determination of Furosine in Thermally Processed Foods by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*. 92, 1460-1463.
- Grosch W., Megele J., 1984, Oxygen Radicals in Chemistry and Biology. Bors W., Saran M., Tait D. (eds.), Walter de Gruyter & Co., Germany. pp. 249-256.
- Haslbeck F., Grosch, W., 1983, Autoxidation of Phenyl Linoleate and Phenyl Oleate: HPLC Analysis of the Major and Minor Monohydroperoxides as Phenyl Hydroxystearates. *Lipids*. 18, 706-713.
- Haslbeck F., Grosch W., Firl J., 1983, Formation of Hydroperoxides with Unconjugated Diene Systems During Autoxidation and Enzymatic Oxygenation of Linoleic Acid. *Biochem. Biophys. Acta*. 750, 185-193.
- Haynes R. K. and Vonwiller S. C., 1990, Iron(III) and Copper(II) Catalyzed Transformations Of Fatty-Acid Hydroperoxides - Efficient Generation of Peroxy-Radicals With Copper(II) Trifluoromethanesulfonate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1102-1104.
- Heijman M. G. J., Nauta H., Levine Y. K., 1985, A Pulse-Radiolysis Study of The Dienyl Radical in Oxygen-Free Linoleate Solutions-Time and Linoleate Concentration-Dependence. *Radiat. Phys. Chem.* 26, 73-82.
- Hiatt R. and McCarrick T., 1975, On "bimolecular initiation" by hydroperoxides. *J. Amer. Chem. Soc.* 97, 5234-5237.

- Hiatt R., Mill T., Mayo F. R., 1968, Homolytic Decompositions of Hydroperoxides .I. Summary and Implications or Autoxidation. *J. Org. Chem.* 33, 1416-1420.
- Hidalgo F., Delgado R., Navarro J., Zamora R., 2010, Asparagine Decarboxylation by Lipid Oxidation Products in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10512-10517.
- Hidalgo F., Gallardo E., Zamora R., 2005, Strecker Type Degradation of Phenylalanine by 4-Hydroxy-2-nonenal in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10254-10259.
- Hidalgo, F. and Zamora R., 2000, The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas y Aceites.* 51, 35-49.
- Hidalgo F. J., and Zamora, R., 1995, In Vitro Production of Long Chain Pyrrole Fatty Esters from Carbonyl-Amine Reactions. *J. Lipid Res.* 36, 725-735.
- Hidalgo, F. J., and Zamora, R., 1995, Characterization of the Products Formed during Microwave Irradiation of the Nonenzymatic Browning Lysine/(E)-4,5-Epoxy-(E)-2-heptenal Model System. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1023-1028.
- Hidalgo F. J., and Zamora R., 1993, Non-Enzymatic Browning and Fluorescence Development in a 4,5-Epoxy- (E) -2-heptenal/Lysine Model System. *Grasas y Aceites, J. Food Sci.* 58, 667-670.
- Hidalgo F.J., Zamora R., Alaiz M., 1992, Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su inter-acción con lípidos peroxidados. II. Mecanismos conocidos de la interacción lípido (oxidado)-proteína. *Grasas y Aceites.* 43, 31-38.
- Hidalgo F. J., Zamora R., Alaiz M., Millán F., Maza M. P., Vioque E., 1987, Interacción entre el Glutathión y Diferentes Oxoácidos Grasos. *Grasas Aceites.* 38, 318-322.
- Hoffman, T., 1999, Quantitative Studies on the Role of Browning Precursors in the Maillard Reaction of Pentoses and Hexoses with L-alanine. *Eur. J. Food Technol.* 209, 113-121.
- Howard J. A. and Ingold K. U., 1968, *Can. J. Chem.* 46, 2661-2666.
- Howard J. A. and Ingold K. U., 1968, The self-reaction of sec-butylperoxy radicals: confirmation of the Russell mechanism. *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 1056 –1058.
- Howard J. A. and Ingold K. U., 1968, Rate Constants for Self-Reactions of N- and Sec-Butylperoxy Radicals and Cyclohexylperoxy Radicals . Deuterium Isotope Effect in Termination of Secondary Peroxy Radicals. *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 1058-1059.

- Karel M., Schaich K. M., Roy R. B., 1975, Interaction of Peroxidizing Methyl Linoleate with Some Proteins and Amino-Acids. *J. Agric. Food Chem.* 23, 159-164.
- Khayat A., Schwall D., 1983, Lipid oxidation in sea-food. *Food Technology.* 37,130–140.
- Knothe G., Kenar J. A., Gunstone F. D., 2007, Chemical Properties. *The Lipid Handbook.* Gunstone F. D., Harwood J. L., Dijkstra A. J. (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group, USA. pp. 535-591.
- Kocadağlı T., Göncüoğlu N., Hamzalıoğlu A., Gökmen V., 2012, In Depth Study of Acrylamide Formation in Coffee during Roasting: Role of Sucrose Decomposition and Lipid Oxidation. *Food&Function.* 3, 970-975.
- Kochi J. K., 1973, Free Radicals. Kochi J. K. (ed.), John Wiley & Sons, Inc, USA. pp. 665-710.
- Köksal İ., Artik N., Şimşek A., Güneş N., 2006, Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry.* 99, 509–515.
- Lindsay D. A., Howard J. A., Horswill E. C., Iton L., Ingold K. U., Cobbley T., Li A., 1973, Bimolecular Self-Reactions of Secondary Peroxy Radicals-Product Studies. *Can. J. Chem.* 51, 870-880.
- Lundberg W. O. and Chipault J. R., 1947, The Oxidation of Methyl Linoleate at Various Temperatures. *J. Amer. Chem. Soc.*, 69, 833-836.
- Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli McLerici C. R., 2001, Review of non-enzymic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology.* 11, 340-346.
- Martins S., Jongen W., Boekel M., 2001, A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology.* 11, 364-373.
- Martins S., Boekel M. 2003, Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chemistry.* 83, 135-142.
- Mayo F. R., 1958, The Oxidation of Unsaturated Compounds. 9. The Effects of Structure on The Rates and Products of Oxidation of Unsaturated Compounds *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 2500-2507.
- Mihelich E. D., 1980, Structure and Stereochemistry of Novel Endoperoxides Isolated from the Sensitized Photo-Oxidation of Methyl Linoleate-Implications for Prostaglandin Biosynthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* 102, 7141-7143.
- Mounts T. L., McWeeny D. J., Evans C. D., Dutton H. J., 1970, Decomposition of Linoleate Hydroperoxides-Precursors of Oxidative Dimers. *Chem. Phys. Lipids.* 4, 197-202.

- Neff W. E., Frankel E. N., Fujimoto K., 1988, Autoxidative Dimerization of Methyl Linolenate and Its Monohydroperoxides, Hydroperoxy Epidioxides and Dihydroperoxides. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 65, 616-623.
- Neff W. E., Frankel E. N., 1980, Quantitative-Analyses of Hydroxystearate Isomers from Hydroperoxides by High-Pressure Liquid-Chromatography of Autoxidized and Photosensitized-Oxidized Fatty Esters. *Lipids.* 15, 587-590.
- Neff W.E., Frankel E.N., Scholfield C.R., Weisleder D., 1978, High-Pressure Liquid Chromatography of Autoxidized Lipids: I. Methyl Oleate and Linoleate. *Lipids.* 13, 415-421.
- Neta P., Dizdaroglu M., 1984, Radiolytic Studies of the Cumyloxyl Radical in Aqueous-Solutions. *Simic M., Sr. J. Chem.,* 24, 25-28.
- Özdemir M., Açkurt F., Yildiz M., Biringen G., Gürcan T., Löker M., 2001, Effect of roasting on some nutrients of hazelnut. *Food Chemistry.* 73, 185-190.
- Özdemir M., Seyhan F.G., Bakan A.K., Ilter S., Özay G., Devres O., 2001, Analysis of internal browning of roasted hazelnuts. *Food Chemistry.* 73, 191-196.
- Porter N. A., Caldwell S. E., Mills K. A., 1995, Mechanisms of Free-Radical Oxidation Of Unsaturated Lipids. 30, 277–290.
- Porter N.A., Mills K.A., Carter R.L., 1994, A Mechanistic Study of Oleate Autooxidation: Competing Peroxyl H-Atom Abstraction and Rearrangement. *J. Am.Chem. Soc.* 116, 6690-6696.
- Porter N.A., 1986, Mechanisms for the Autoxidation of Polyunsaturated Lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262-268
- Porter N. A., Lehman L. S., Weber B. A., Smith K. J., 1981, Unified Mechanism for Poly-Unsaturated Fatty-Acid Autoxidation - Competition of Peroxy Radical Hydrogen-Atom Abstraction, Beta-Scission and Cyclization. *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 6447-6455.
- Pryor W. A., 1978, Formation of Free-Radicals and Consequences of Their Reactions Invivo. *Photochem. Photobiol.* 28, 787-801.
- Rao P. S., Ayres S. M., Mueller H. S., 1982, Identity of Peroxy-Radicals Produced from Arachidonic-Acid in Oxygenated Solutions as Studied by Pulse-Radiolysis Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 1532-1536.
- Reich L., and Stivala S. S., 1969, Autoxidation of Hydrocarbons and Polyolefins. Marcel Dekker, USA.
- Schaich K. M., 2005, Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products.* Shahidi F. (ed.), John Wiley & Sons, Inc., USA. pp. 269-355.

- Schaich K. M. and Borg D. C., 1984, Oxygen Radicals in Chemistry and Biology. Bors W., Saran M., Tait D. (eds.), Walter de Gruyter, Germany, pp. 603-606.
- Schauenstein E., 1967, Autoxidation of Polyunsaturated Esters in Water - Chemical Structure and Biological Activity of Products. *J. Lipid Res.* 8, 417-428.
- Schieberle P., Tsoukalas B., W. Grosch, 1979, Decomposition of Linoleic-Acid Hydroperoxides by Radicals .1. Structures of Products of Methyl 13-Hydroperoxy-Cis, Trans-9,11-Octadecadienoate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168, 448-456.
- Schneider C., Boeglin W., Yin H., Stec D., Hachey D., Porter N., Brash A., 2005, Synthesis of Dihydroperoxides of Linoleic and Linolenic Acids and Studies on Their Transformation to 4-Hydroperoxynonenal. *Lipids.* 40, 1155-1162.
- Seppanen C.M. and Csallany A., 2001, Simultaneous Determination of Lipophilic Aldehydes by High-Performance Liquid Chromatography in Vegetable Oil. *JAOCS.* 78, No:12.
- Sliwiok J., Kowalska T., Kowalski W., Biernat A., 1974, Influence of Hydrogen-Bond Association on Destruction of Hydroperoxides in Autoxidation Process of Oleyl Alcohol, Oleic Acid and Methyl Oleate. *Microchem. J.* 19, 362-372.
- Smith P., and Waters W. A., 1969, Oxidations of Organic Compounds by Cobaltic Salts.12. Oxidations of Unsaturated Acids. *J. Chem. Soc. B., Phys. Org. Chem.* 462-467.
- Sohn M. and Ho C. H., 1995, Ammonia Generation during Thermal Degradation of Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 743, No:12.
- Spiteller P., Kern W., Reiner J., Spiteller G., 2001, Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1531, 188-208.
- Şenyuva H. Z., Gökmen V., 2007, Potential of furan formation in hazelnuts during heat treatment. *Food Additives and Contaminants.* 24, 136-142.
- Tsentlovich Y. P., Kulik L. V., Gritsan N. P., Yurkovskaya A. V., 1998, Solvent Effect on the Rate of Beta-Scission of the Tert-Butoxyl Radical. *J. Phys. Chem.*, 102, 7975-7980.
- Van Sickle D. E., Mayo F. R., Gould E. S., Arluck R. M., 1967, Effects of Experimental Variables in Oxidations of Alkenes. *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 977-984.
- Villamiel M., Castillo M. D., Corzo N., 2006, Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing.* Hui Y. H. (ed.), Blackwell Publishing, USA. pp. 71-103.

- Walling C., Waits H. P., Milanovic J., Pappiaonnou C. G., 1970, Polar and Radical Paths in Decomposition of Diacyl Peroxides. *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 4927-4932.
- Walling C. and Padwa A., 1963, Positive Halogen Compounds 6. Effects of Structure and Medium on Beta-Scission of Alkoxy Radicals. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 1593-1597.
- WanJun T., Cunxin W., Donghua C., 2006, An investigation of the pyrolysis kinetics of some aliphatic amino acids. *Anal. Appl. Pyrolysis.* 75, 49-53.
- Wassef W. Nawar, 1996, Lipids. Food Chemistry. Fennema O. R. (ed.), Marcel Dekker, Inc., USA. pp. 225-321.
- Waters W. A., 1971, Kinetics and Mechanism of Metal-Catalyzed Autoxidation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 48, 427-433.
- Wu G.S., Stein R.A., Mead J.F., 1978, Autoxidation of Fatty Acid Monolayers Absorbed on Silica Gel. II. Rates and Products. *Lipids.* 12, 971-978.
- Wu G. S., Stein R. A., Autoxidation of Fatty-Acid Monolayers Adsorbed on Silica-Gel 3. Effects of Saturated Fatty-Acids and Cholesterol. Mead J. F., 1978, *Lipids.* 13, 517-524.
- Yang M-H., and Schaich K. M., 1996, Factors Affecting DNA Damage Caused by Lipid Hydroperoxides and Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 225–236.
- Yin D., 1996, Biochemical basis of lipofuscin, ceroid and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Biology and Medicine.* 21, 871-888.
- Yong S. H. and Karel M., 1979, Cleavage of the Imidazole Ring in Histidyl Residue Analogs Reacted With Peroxidizing Lipids. *J. Food Sci.* 22, 568-574.
- Zamora R. and Hidalgo F. J., 1994, Modification of Lysine Amino Groups by the Lipid Peroxidation Product 4,5 (E)-Epoxy-2 (E)-heptenal. *Lipids.* 29, 243-249.
- Zamora R. and Hidalgo F., 2005, Coordinate Contribution of Lipid Oxidation and Maillard Reaction to the Nonenzymatic Food Browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 45, 49-59.
- Zamora R. and Hidalgo F., 2011, The Maillard reaction and lipid oxidation. *Lipid Technology.* 23, 59-62.
- Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F. J., 1999, Modification of Histidine Residues by 4,5-Epoxy-2-alkenals. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 654-660.
- Zamora R., Gallardo E., Hidalgo F., 2007, Strecker Degradation of Phenylalanine Initiated by 2,4-Decadienal or Methyl 13-Oxo-octadeca-9,11-dienoate in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1308-1314.

Zamora R., Gallardo E., Hidalgo F., 2008, Model Studies on the Degradation of Phenylalanine Initiated by Lipid Hydroperoxides and Their Secondary and Tertiary Oxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7970-7975.

Zamora R., Ríos, J. J., and Hidalgo, F. J., 1994, Formation of Volatile Pyrrole Products from Epoxyalkenal/Protein Reactions. *J. Sci. Food Agric.*, 66, 543-546.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yeşim Karademir

Doğum Yeri: Rize

Doğum Tarihi: 26.12.1988

Medeni Hali: Bekar

Lise: Özel Kopuzlar Lisesi – Rize, 2002-2005

Lisans: Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü – Ankara, 2005-2010

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi: Tarımsal İklimleme ve Teknolojik Araştırmalar Anonim Şirketi,
Ankara, Gıda Mühendisi, 03.2011-09.2011