

**MAKARNALIK BUĞDAY VE MAKARNADA EKMEKLİK
BUĞDAYIN TESPİT EDİLMESİ İÇİN BAZI
SPEKTROSKOPİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
KULLANILMASI**

**UTILIZATION OF SPECTROSCOPIC ANALYSIS
METHODS FOR DETECTION OF COMMON WHEAT IN
PASTA AND DURUM WHEAT**

ASLIHAN ÜNÜVAR

PROF. DR. HAMİT KÖKSEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

MAKARNALIK BUĞDAY VE MAKARNADA EKMEKLİK BUĞDAYIN TESPİT EDİLMESİ İÇİN BAZI SPEKTROSKOPİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN KULLANILMASI

Aslıhan ÜNÜVAR

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hamit KÖKSEL

Eylül 2020, 141 sayfa

Ekmeklik buğdayın makarna üretim kalitesinin zayıf olmasına rağmen, ekonomik kaygılar ve daha uygun fiyatlı olması nedeniyle bazı makarna üreticileri makarna üretirken ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) ile makarnalık buğday (*Triticum durum*) karışımını kullanmaktadır. Etiketinde belirtmeksizin makarnaya ekmeklik buğday ilave edilmesi makarna tağşişi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle makarna tağşişinin tespiti için hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu amaçla bu tez kapsamında ekmeklik ve makarnalık buğdayların ayrılması ve un ve makarna da tağşişin tespiti için farklı spektroskopik yöntemlerin performansı araştırılmıştır.

Temel Bileşen Analizi (PCA), Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi (PLS-DA), Kısmi En Küçük Kareler Regresyon analizi (PLSR) gibi çeşitli veri işleme yöntemleriyle kombine edilmiş Raman spektroskopisi (RS), yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRS), azaltılmış toplam yansıtma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIRS), senkronize floresans spektroskopisi (SFS) ve lazer indüklü plazma spektroskopisi (LIBS) örneklerin analizi için kullanılmıştır. Ayrıca kapsamlı

karakterizyon amacıyla ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanılmıştır.

Tezin ilk aşamasında 120 adet ekmeklik ve 119 adet makarnalık buğday unu örneğinin ayrıştırılması amacıyla RS, LIBS, ATR-FTIRS, NIR, SFS ve RP-HPLC cihazları kullanılmıştır. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının sınıflandırılmasında en etkili yöntemin SFS olduğu bulunmuştur. SFS tekniği ile ekmeklik ve makarnalık buğdayların birbirinden 1.000 duyarlılık ve özgünlük oranı ile net bir şekilde ayrıldığı görülmüştür. SFS'nin performans parametreleri kalibrasyon (RMSEC), çapraz validasyon (RMSECV) ve tahmin (RMSEP) modellerinin hata kareler ortalamasının karekökü değerleri sırasıyla 0.164, 0.171 ve 0.194'tür. ATR-FTIR ve NIR spektroskopilerinin benzer performans sergilediği bulunmuştur. ATR-FTIRS ve NIRS'in çapraz validasyon duyarlılık ve özgünlük değerleri 0.990'ken kalibrasyon ve tahmin duyarlılık ve özgünlük değerleri 1.000'dir. LIBS'in buğdayların ayrılma potansiyeli, NIRS ve ATR-FTIRS'dan daha az hassasiyete sahiptir. LIBS'in RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.206, 0.185 ve 0.189 ile Hotelling's T^2 değeri 99.90 bulunmuştur. Raman spektroskopisinin buğdayları ayırma kabiliyetinin diğer spektroskopik yöntemlere göre düşük olduğu görülmüştür. RS tahmin grubunun duyarlılığı 0.350 iken çapraz validasyon duyarlılığı ve özgüllüğü 0.960 ve 1.000'dir. Ayrıca tez kapsamında örneklerin kapsamlı karakterizasyonu gerçekleştirmek amacıyla RP-HPLC kullanılmıştır. RP-HPLC'nin kemometrik analiz sonuçları doğru pozitif oranı (DPO) ve doğru negatif oranı (DNO) 1.000 iken; yanlış pozitif oran (YPO) ve yanlış negatif oran (YNO) 0.000'dir. RP-HPLC diğer tüm metotların içinde en düşük RMSEP (0.144) değerine sahiptir.

Tezin ikinci aşamasında 28 adet paçal unda ve 28 tane makarna örneğindeki tağış oranının tespit edilmesi amaçlanmış, aynı spektroskopik yöntemler kullanılmıştır. Paçal unların spektroskopik analiz sonuçlarına göre en etkili yöntemin LIBS olduğu bulunmuştur. LIBS diğer yöntemlere göre en düşük tespit limiti (LOD, 0.523), tayin limiti (LOQ, 1.584) ve RMSEP (5.297) değerlerine sahip olmasının yanı sıra en yüksek tahmin R^2 (0.961) değerine sahiptir. LIBS'in kalibrasyon ve çapraz kalibrasyon grafiği R^2 değerleri 0.971 ve 0.951 şeklindedir. Tezin ilk aşamasında olduğu gibi ATR-FTIRS

ve NIRS'in performansının benzer olduğu görülmüştür. ATR-FTIR ve NIR'in Hotelling's T^2 (%) ve Q-Residuals (%) değerleri 100.00 ve 0.00'dır. Raman spektroskopisinin un karışımlarındaki tağşiş oranının tespitinde de en kötü performansa sahip olduğu görülmüştür. Raman spektroskopisinin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri 10.893, 15.022 ve 13.884 dir. Paçal unların RP-HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek kalibrasyon R^2 (0.994) ve çapraz validasyon R^2 (0.990) değerleri RP-HPLC'den elde edilmiştir. RP-HPLC'in performans parametrelerinde RMSEC ve RMSECV değerleri sırasıyla 2.251 ve 3.522 şeklinde bulunmuştur.

Farklı oranlarda farina ilave edilerek üretilen makarnaların spektroskopik sonuçları incelendiğinde ise en düşük LOD (0.494) ve LOQ (1.496) değerlerinin ATR-FTIRS ile elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca diğer spektroskopik yöntemlere göre ATR-FTIRS daha düşük RMSEC (7.781), RMSECV (9.417) ve RMSEP (8.908) değerlerine sahiptir. ATR-FTIRS'nin kalibrasyon R^2 , çapraz validasyon R^2 ve tahmin R^2 değerleri sırasıyla 0.922, 0.885 ve 0.903'tür. Makarnadaki tağşiş belirlemede NIRS'in performansı oldukça iyidir. NIRS'in performans parametrelerinden LOD ve LOQ değerleri 1.079 ve 3.270'tir. NIRS'nin diğer performans parametrelerinden RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri 9.595, 12.926 ve 8.747 şeklindedir. RP-HPLC en yüksek LOD (6.473) ve LOQ (19.616) değerlerine sahip olmasına rağmen, RP-HPLC'nin tağşiş tespit etme performansının spektroskopik yöntemlere göre iyi olduğu görülmüştür. RP-HPLC'nin kalibrasyon R^2 , çapraz validasyon R^2 ve tahmin R^2 değerleri 0.997, 0.995 ve 0.995'tir. Bu nedenle makarnadaki tağşiş oranını belirlemek için RP-HPLC'nin yüksek bir potansiyele sahip tespit edilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde kemometri ile kombine edilen spektroskopik tekniklerin ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ayrılması ile makarnalık buğday ununa ve makarnaya ilave edilen ekmeklik buğday ununu tespitinde genel olarak iyi bir potansiyel sahip olduğu tespit edilmiştir. Saf buğday unlarının ayrılmasında SFS'nin etkili yöntem olduğu görülmüştür. Paçal un örneklerinde tağşişin belirlenmesi için en iyi performansın ise LIBS'e ait olduğu saptanmıştır. Makarna örneklerindeki tağşişin tespiti için ise spektroskopik analizlerin içinde en iyi sonuç ATR-FTIRS ile elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Buğdayın Sınıflandırılması, Makarna Tağışı, Raman Spektroskopisi, Yakın Kızılötesi Spektroskopisi, Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi, Senkronize Floresans Spektroskopi ve Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

ABSTRACT

UTILIZATION OF SPECTROSCOPIC ANALYSIS METHODS FOR DETECTION OF COMMON WHEAT IN PASTA AND DURUM WHEAT

Ashhan ÜNÜVAR

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Hamit KÖKSEL

September 2020, 141 pages

Although common wheat (*Triticum aestivum*) has poor pasta making quality, some pasta producers blend common wheat with durum wheat (*Triticum durum*) in pasta production because of economic concerns and lower price of common wheat. However, addition of common wheat to pasta without indicating on the label is considered adulteration. Hence, there is a need for developing fast and reliable methods to detect adulteration. Therefore, in this thesis, the performance of different spectroscopic methods was investigated for discrimination of common and durum wheat and the detection of adulteration in flour and pasta.

Raman spectroscopy (RS), near infrared spectroscopy (NIRS), attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIRS), synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) and laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) were used to analyse samples with combination of some chemometric methods such as principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and partial least squares regression analysis (PLSR).

In the first part of the thesis; RS, LIBS, ATR-FTIRS, NIRS, SFS and RP-HPLC were used to discriminate 120 common wheat and 119 durum wheat flour samples. The most effective method was SFS for discrimination of common and durum wheat flour. It was observed that common and durum wheat were clearly separated from each other by SFS with a sensitivity and specificity ratio of 1.000. Performance parameters of SFS; root mean square error of calibration (RMSEC), root mean squared error of cross-validation (RMSECV) and root mean square error of prediction (RMSEP) were 0.164, 0.171, and 0.194, respectively. The performance of NIR and ATR-FTIR was very similar. It has been found that the cross validation sensitivity and specificity values of ATR-FTIR and NIR were 0.990 while their calibration and prediction sensitivity and specificity values were 1.000. Common and durum wheat discrimination performance of LIBS was less sensitive than NIRS and ATR-FTIRS. RMSEC, RMSECV and RMSEP values of LIBS were 0.206, 0.185 and 0.189, and Hotelling's T^2 value was 99.90. The discrimination ability of RS was less than those of other spectroscopic methods. The prediction sensitivity of the RS was 0.350, while the cross validation sensitivity and specificity of RS were 0.960 and 1.000. In addition to spectroscopic methods, reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used for extensive characterization of the samples. The results of the chemometric analysis of RP-HPLC; true positive rate (TPR) and true negative rate (TNR) were 1.000 and false positive rate (FPR) and false negative rate (FNR) were 0.000. The RMSEP of RP-HPLC had the lowest value (0.144) in all methods.

In the second part of the thesis, the aim was to determine the rate of adulteration in blended flour and pasta samples. The same spectroscopic methods were used to analyse 28 blended flour samples and 28 pasta samples. According to the result of blended flour samples, the most effective method was LIBS. LIBS had the lowest limit of detection (LOD, 0.523), limit of quantification (LOQ, 1.584) and RMSEP (5.297) values compared to other methods, as well as the highest coefficient of determination (R^2 , 0.961) for detection of common wheat flour in durum wheat flour samples. The calibration and cross validation R^2 values of LIBS were 0.971 and 0.951. As in the first part of the thesis, the performance of ATR-FTIRS and NIRS was very similar. The

Hotelling's T^2 (%) and Q-Residuals (%) values of NIRS and ATR-FTIRS were 100.00 and 0.00. RS had shown the worst performance in detecting the rate of adulteration in blended flour samples similar to its performance in discrimination of the wheat samples. The RMSEC, RMSECV and RMSEP values of RS were 10.893, 15.022 and 13.884. Blended common and durum wheat samples were also analyzed using RP-HPLC. The highest calibration R^2 (0.994) and cross validation R^2 (0.990) values were obtained from RP-HPLC. It was found that the performance parameters of RP-HPLC were 2.251 and 3.522 for RMSEC and RMSECV values, respectively.

According to the result of the pasta samples prepared from common and durum wheat blends, the lowest LOD (0.494) and LOQ (1.496) values were obtained from ATR-FTIRS. ATR-FTIRS had also lower RMSEC (7.781), RMSECV (9.417) and RMSEP (8.908) values compared to the other spectroscopic methods. The calibration R^2 , cross validation R^2 and prediction R^2 values of ATR-FTIRS were 0.922, 0.885 and 0.903, respectively. NIRS was also quite able to determine the addition level of farina in pasta. The LOD and LOQ values of NIRS were 1.079 and 3.270. The other performance parameters of NIRS; RMSEC, RMSECV and RMSEP were 9.595, 12.926 and 8.747, respectively. Although RP-HPLC had the highest LOD (6.473) and LOQ (19.616) values, the performance of RP-HPLC for the detection of adulteration was better than other spectroscopic methods with calibration R^2 , cross validation R^2 and prediction R^2 values 0.997, 0.995 and 0.995, respectively. Hence, RP-HPLC seems to have a high potential to determine the adulteration rate in pasta.

The results revealed that spectroscopic techniques combined with chemometrics showed generally good potential to discriminate common and durum wheat flour samples and to determine the addition level of common wheat in durum wheat flour and pasta samples. It was found that the most effective method for discrimination of common and durum wheat flours was SFS. On the other hand, LIBS and ATR-FTIRS had the best performance in determination of the adulteration in blended flour and blended pasta samples, respectively.

Keywords: Wheat Discrimination, Pasta Adulteration, Raman Spectroscopy, Near-Infrared Spectroscopy, Synchronous Fluorescence Spectroscopy, Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, Laser-induced Breakdown Spectroscopy

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın en başından itibaren her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Hamit Köksel'e,

Tez süresince planlanması ve yürütülmesinde bilgisi ve deneyimlerini paylaşan ve tüm laboratuvar alt yapısını ve cihazlarını paylaşan hocam Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya, ABD'de tezimin son aşamasındaki deneylerimi gerçekleştirmemi sağlayan, tüm bilgi birikimini ve tecrübesini benle paylaşan Kuzey Dakota Eyalet Üniversite Hububat Bilimi Bölümü'nden (North Dakota State University, NDSU) Prof. Dr. Şenay Şimşek'e, Yurtdışı araştırma tecrübesine olanak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı'na,

Deney faaliyetlerimi gerçekleştirilmesinde cihaz alt yapısını paylaşan Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı'ndan (USDA) Prof. Dr. Jae-Bom Ohm, makarna üretimi için laboratuvarını kullanmamı sağlayan Kuzey Dakota Eyalet Üniversite Hububat Bilimi Bölümünden Prof. Dr. Frank A. Manthey ve ekibine,

Tez izleme komitelerimde ve tez savunma jürimde yer alarak görüş ve katkılarını sunan değerli hocalarım Prof. Dr. Berrin Özkaya ve Doç. Dr. Remziye Yılmaz ile Prof. Dr. Behiç Mert ve Prof. Dr. Dilek Sivri Özay'a,

Tez çalışmamda kullandığım saf çeşit buğdayları temin eden, öğütmeme ve makarna üretmeme olanak sağlayan Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Kalite ve Değerlendirme Bölümü Başkanı Sayın Safure Güler ile Sayın Turgay Şanal ve her zaman yakın desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Dr. Buket Çetiner, gıda yüksek mühendisi Ferda Ünsal ve Dr. Oğuz Acar ve tüm personeline,

Tez çalışmamda karşılaştığım her sıkıntıda benden yardımlarını esirgemeyen katkı sağlayan değerli arkadaşlarım Dr. H. Tümay Temiz, Dr. H. Efe Geniş, Dr. G. Akif Bozkurt ve gıda yüksek mühendisi Duygu Geniş'e,

Tezin son aşamasındaki deneylerin yapımında yanımda olan ve saf çeşit Amerikan buğdaylarını öğütmeme olanak sağlayan Kuzey Dakota Eyalet Üniversite Hububat

Bilimi Bölümü'nden Hububat Bilimi Bölümünden başta Kristin Whitney, DeLane Olsen, Megan Louise Hest, Gwen Thomas olmak üzere Prof. Dr. Şenay Şimşek'in tüm hububat araştırma grubu ekibine,

Laboratuvar çalışmalarındaki destekleri için Güverte Laboratuvarı Çalışma Grubundan gıda yüksek mühendisi Banu Sezer, gıda yüksek mühendisi Şefika Evran, gıda yüksek mühendisi Kübra Tayyarcan ve diğer çalışma grubu üyeleri ile NANOSENS İleri Teknolojiler Enerji Makina Proje Tasarım Danışmanlık A.Ş. çalışanlarına,

Buğdayları öğütmemde cihaz alt yapısı sağlayan Bastak A.Ş'den Sayın Zeki Demirtaşoğlu,

Doktora süresince destekleri için Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği hocaları ile personeline ve Hububat Araştırma Grubu'ndaki ekip arkadaşlarıma,

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Türk Akreditasyon Kurumu'dan Sayın Soner Karataş'a, değerli arkadaşım Azize Kırgöz ve kurumdaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Seher, Kamile, Dilay, İkbâl, Peiyi, Lily, Jayani, Ganime, Mehmet, Serap, Nadia, Veronica, Benjamin, Tom, Kaitlyn'e,

Yaşamayı daha anlamlı kılan, hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve güç veren, hoşgörü ve anlayışlarını esirgemeyen ablam Dr. F. İlknur Ünüvar, annem Şerife Ünüvar ve babam Dr. Süleyman Ünüvar'a tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	4
2.1. Makarna ve Makarna Tağışı.....	4
2.2. Spektroskopik Analiz Yöntemleri.....	13
2.2.1. Yakın Kızılötesi Spektroskopisi.....	13
2.2.2. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	17
2.2.3. Senkronize Floresans Spektroskopisi	21
2.2.4. Raman Spektroskopisi	26
2.2.5. Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi	31
2.3. Kromatografik Analiz.....	34
2.4. Kemometrik Analiz Yöntemleri	39
2.5. Tez Çalışmasının Amaçları.....	45
3. MATERYAL VE METOT	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Örnekleri	46
3.1.2. Paçal Un Örnekleri	46
3.1.3. Makarna Örnekleri.....	48
3.2. Metot	50
3.2.1. Kimyasal Analizler ve Renk Analizi	50
3.2.1.1. Rutubet ve Kül Tayini.....	50

3.2.1.2.	Protein Tayini	50
3.2.1.3.	Renk Analizi	50
3.2.2.	Spektroskopik Analizler	50
3.2.2.1.	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi	50
3.2.2.2.	Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	51
3.2.2.3.	Senkronize Floresans Spektroskopisi.....	51
3.2.2.4.	Raman Spektroskopisi.....	51
3.2.2.5.	Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi.....	51
3.2.3.	Kromatografik Analiz	52
3.2.4.	İstatistiksel Analizler	52
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	53
4.1.	Kimyasal Analizler ve Renk Analizi Sonuçları	53
4.2.	Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Unların Spektroskopik ve Kromatografik Analiz Sonuçları	57
4.2.1.	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi	57
4.2.2.	Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	62
4.2.3.	Senkronize Floresans Spektroskopisi	67
4.2.4.	Raman Spektroskopisi	72
4.2.5.	Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi	76
4.2.6.	Ters Farz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	83
4.3.	Paçal Un ve Makarna Örneklerinin Spektroskopik ve Kromatografik Analiz Sonuçları	89
4.3.1.	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi	89
4.3.2.	Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	96
4.3.3.	Senkronize Floresans Spektroskopisi	102
4.3.4.	Raman Spektroskopisi	108
4.3.5.	Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi	112
4.3.6.	Ters Farz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	116
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	124

KAYNAKLAR	128
EKLER	142
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	142
ÖZGEÇMİŞ	143

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. NIRS ve RP-HPLC yöntemlerinin şekilsel gösterimi.....	2
Şekil 2.1. Dünya makarna üretim yüzdesinin dağılımı (%).....	6
Şekil 2.2. Yıllık kişi başı ortalama makarna ve erişte tüketimi (kg).....	9
Şekil 2.3. NIR ışımalarının çeşitleri.....	14
Şekil 2.4. Michelson İnterferometre Diyagramı	19
Şekil 2.5. Senkronize floresans taraması	23
Şekil 2.6. Çeşitli titreşim spektroskopilerindeki spektroskopik geçişler	28
Şekil 2.7. Gliadinlerin RP-HPLC profili	38
Şekil 4.1. Ekmeklik ve makarnalık irmik ve unların PCA skor grafiği	57
Şekil 4.2. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama NIR spektrumları	58
Şekil 4.3. NIR verilerine ait PCA skor grafiği	59
Şekil 4.4. NIRS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri	61
Şekil 4.5. NIRS verilerine ait PLS-DA skor grafikleri.....	62
Şekil 4.6. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama ATR-FTIR spektrumları	62
Şekil 4.7. ATR-FTIRS verilerine ait PCA skor grafiği	63
Şekil 4.8. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri.....	66
Şekil 4.9. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA skor grafiği	67
Şekil 4.10. Ekmeklik (a) ve Makarnalık (b) Buğday Unlarının Ortalama SFS spektrumları	67
Şekil 4.11. SFS verilerine ait PCA skor grafiği	69
Şekil 4.12. SFS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri.....	71
Şekil 4.13. SFS verilerine ait PLS-DA skor grafiği	72
Şekil 4.14. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama RS spektrumları	72
Şekil 4.15. RS verilerine ait PCA skor grafiği	73
Şekil 4.16. RS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri	75
Şekil 4.17. RS verilerine ait PLS-DA modeli skor grafiği	76
Şekil 4.18. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama LIBS spektrumları	77
Şekil 4.19. LIBS verilerine ait PCA skor grafiği	78

Şekil 4.20. LIBS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri.....	80
Şekil 4.21. LIBS verilerine ait PLS-DA skor grafiği	81
Şekil 4.22. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama kromatogramları	83
Şekil 4.23. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri	86
Şekil 4.24. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA skor grafiği.....	87
Şekil 4.25. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama NIR spektrumları	90
Şekil 4.26. Paçal unlarının NIRS verilerine ait PLSR modeli	93
Şekil 4.27. Makarna örneklerinin NIRS verilerine ait PLSR modeli.....	95
Şekil 4.28. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama ATR-FTIR spektrumları ..	96
Şekil 4.29. Paçal unlarının ATR-FTIRS verilerine ait PLSR modeli	99
Şekil 4.30. Makarna örneklerinin ATR-FTIRS verilerine ait PLSR modeli	101
Şekil 4.31. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama SFS spektrumları	102
Şekil 4.32. Paçal unlarının SFS verilerine ait PLSR modeli	105
Şekil 4.33. Makarna örneklerinin SFS verilerine ait PLSR modeli	108
Şekil 4.34. Paçal un örneklerinin ortalama RS spektrumları.....	109
Şekil 4.35. Paçal unlarının RS verilerine ait PLSR modeli	111
Şekil 4.36. Paçal un örneklerinin ortalama LIBS spektrumları	112
Şekil 4.37. Paçal unlarının LIBS verilerine ait PLSR modeli	116
Şekil 4.38. Paçal un örneklerinin ortalama RP-HPLC kromatogramları	117
Şekil 4.39. Paçal unlarının RP-HPLC verilerine ait PLSR modeli.....	119
Şekil 4.40. Makarna örneklerinin ortalama RP-HPLC kromatogramları.....	120
Şekil 4.41. Makarna örneklerinin RP-HPLC verilerine ait PLSR modeli.....	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ülkelere göre 2015 yılı kişi başı makarna tüketim verileri	8
Çizelge 2.2. Farklı hammadde ve makarnaların özellikleri	10
Çizelge 3.1. Makarnalık unlara ilave edilen ekmeklik un yüzdesi (%).....	47
Çizelge 3.2. Makarnalık örneklerin yüzdeleri.....	49
Çizelge 4.1. Ekmeklik buğday unlarının ortalama kimyasal özellikleri ve renk değerleri	53
Çizelge 4.2. Makarnalık buğday unlarının ortalama kimyasal özellikleri ve renk değerleri.....	54
Çizelge 4.3. Paçal unların kimyasal özellikleri ve renk değerleri.....	55
Çizelge 4.4. Makarna örneklerinin kimyasal özellikleri ve renk değerleri.....	56
Çizelge 4.5. NIRS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri	60
Çizelge 4.6. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri	65
Çizelge 4.7. SFS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri.....	70
Çizelge 4.8. RS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri	74
Çizelge 4.9. LIBS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri.....	79
Çizelge 4.10. PLS-DA modellerine ait hata matrisi.....	82
Çizelge 4.11. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri	85
Çizelge 4.12. PLS-DA modellerinin performans parametreleri.....	88
Çizelge 4.13. Paçal unların NIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri	92
Çizelge 4.14. Makarna örneklerinin NIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri	94
Çizelge 4.15. Paçal unların ATR-FTIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri	98
Çizelge 4.16. Makarna örneklerinin ATR-FTIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri.....	100
Çizelge 4.17. Paçal unların SFS verilerine ait PLSR performans parametreleri	104
Çizelge 4.18. Makarna örneklerinin SFS verilerine ait PLSR performans parametreleri	107

Çizelge 4.19. Paçal unların RS verilerine ait PLSR performans parametreleri.....	110
Çizelge 4.20. LIBS spektrumlarının muhtemel element tablosu	113
Çizelge 4.21. Paçal unların LIBS verilerine ait PLSR performans parametreleri	115
Çizelge 4.22. Paçal unların RP-HPLC verilerine ait PLSR performans parametreleri.	118
Çizelge 4.23. Makarna örneklerinin RP-HPLC verilerine ait PLSR performans parametreleri.....	121
Çizelge 4.24. Paçal un ve makarna örneklerinin PLSR performans parametreleri.....	123

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATR-FTIRS	Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
cm	Santimetre
DN	Doğru Negatif
DNO	Doğru Negatif Oranı
DP	Doğru Pozitif
DPO	Doğru Pozitif Oranı
GD	Gizli Değişken
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IR	Kızılötesi (Infrared)
LED	Lazer Emisyon Diyotu
LIBS	Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Tayin Limiti
MIR	Orta Kızılötesi
NIRS	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi
nm	Nanometre
PC	Temel Bileşen
PCA	Temel Bileşen Analizi
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi
PLSR	Kısmi En Küçük Kareler Regresyon

RMSEC	Kalibrasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RMSECV	Çapraz Validasyonun Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RMSEP	Tahmin Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RS	Raman Spektroskopisi
SFS	Senkronize Floresans Spektroskopi
YN	Yanlış Negatif
YNO	Yanlış Negatif Oranı
YP	Yanlış Pozitif
YPO	Yanlış Pozitif Oranı

Simgeler

α	alfa
β	beta
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
Cu	Bakır
λ	Dalga boyu
e	Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi
Fe	Demir
γ	gama
H	Hidrojen
I	İyot
ω	omega
K	Potasyum
$k_{1,2}$	Sabit Değer

Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
N	Azot
Na	Sodyum
O	Oksijen
P	Fosfor
S	Kükürt
Sp	Standart Sapma
R ²	Belirleme Katsayısı
Zn	Çinko

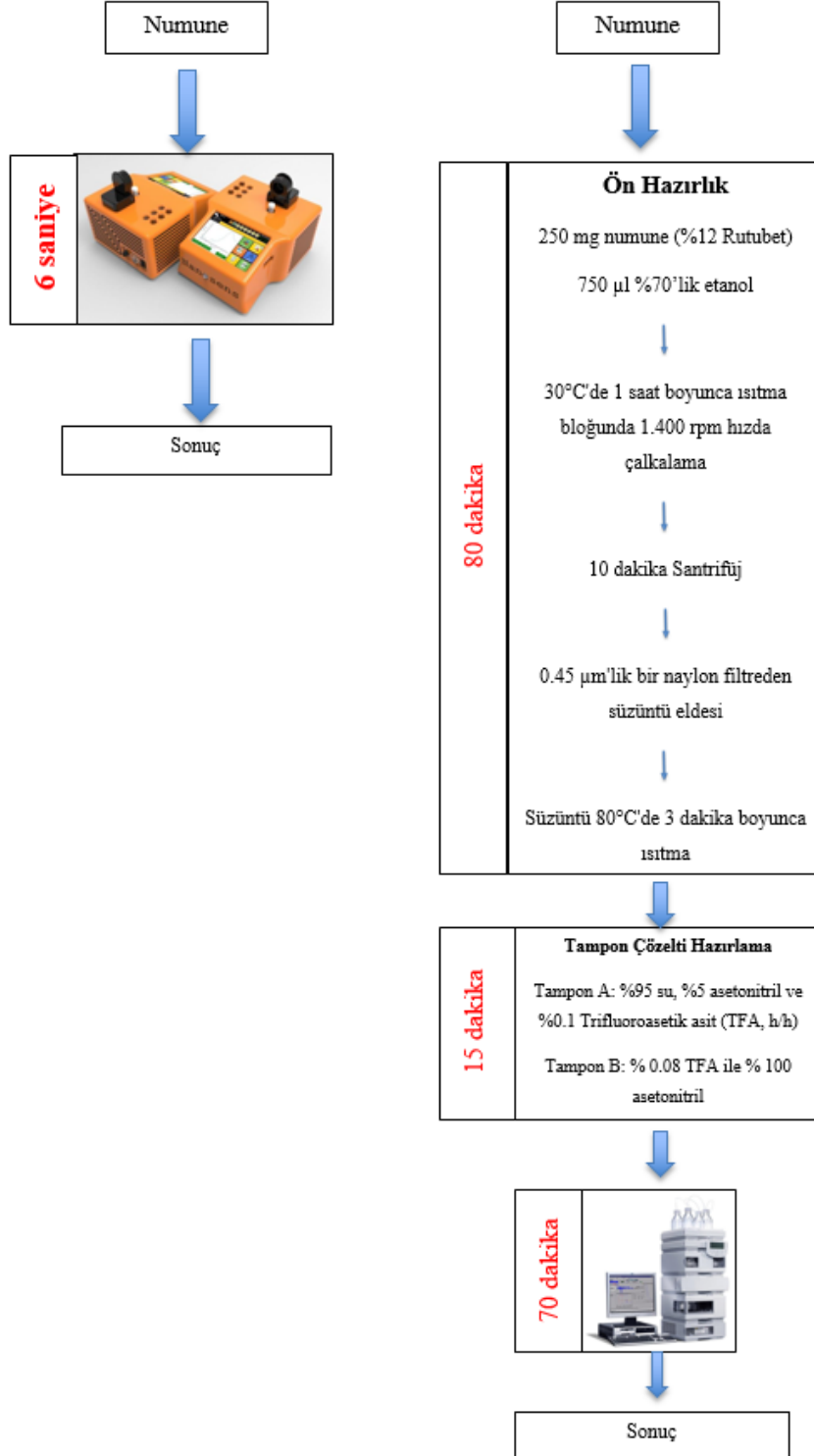
1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde en temel besin kaynağı olan buğdayın botanik olarak birçok türü mevcuttur. Ancak bunlardan iki tanesi; *Triticum aestivum* ve *Triticum durum* daha fazla ekonomik ve ticari öneme sahiptir. Buğdayın en yaygın türü *Triticum aestivum* olup ekmek üretiminde kullanılırken, makarna üretiminde ise genellikle *Triticum durum* kullanılmaktadır (Ertugay, 1982). Buğdaydan elde edilen gıda ürünlerinde ekmek birinci sırayı alırken makarna ve erişte tipi ürünler ikinci sırada yer almaktadır. Ekonomik ve besleyici özellikleri nedeniyle makarnanın tüketimi dünya genelinde giderek artmaktadır.

Makarna dünya çapında çok önemli bir besin olmasının yanı sıra birçok ekonomik sonucu olan önemli bir endüstriyel konudur (Ziegler ve ark., 2016). Makarna üretiminde *Triticum durum* kullanmak yerine ekonomik kaygılar ve fiyat avantajı göz önüne alınarak uygun olmayan bir şekilde *Triticum aestivum* kullanılması ile karşılaşmaktadır. Makarna sektöründe büyüme ile orantılı olarak tağşiş potansiyeli artmaktadır. Makarna üretimi yasal düzenlemelere tabi olan Türkiye, İtalya ve Fransa gibi bazı ülkelerde tağşişe konu olmaktadır. Ayrıca yasal zorunluluğu olmayan ülkelerde de etiketinde belirtilmeksizin, durum ve ekmeklik buğday karışımından üretilen makarna, gıda tağşişi olarak kabul edilmektedir ve tağşişle tüketiciler aldatılmaktadır. Makarna piyasası ve pazarı için tağşişin tespiti ve tanımlanması önem arz etmektedir. Gıda tağşişinin önlenmesi ve tüketicilerin korunması için ise en kritik konu tağşişin hızla tespit edilmesidir.

Tüketiciyi ve yasal zorunlulukların yanı sıra teknolojik özellikleri nedeniyle makarna üretiminde durum buğdayı kullanan dürüst üreticiyi korumak için, ekmeklik ve makarnalık buğdayların ayrımının yapılabilmesi, un ve makarnada tağşişin tespiti açısından önemlidir. Makarnadaki tağşişin tespiti için uluslararası geçerliliği olan standart bir metodun olmayışı sadece Türkiye'ye özgü bir problem olmayıp uluslararası bir problemdir. Birçok araştırma grubu tağşişin tespiti için çeşitli yöntemler araştırmıştır. Literatürde çeşitli klasik ve konvansiyonel yöntemler geliştirilmiş ve yayınlanmıştır. Ancak bu yöntemler çoğunlukla zaman alan, numune hazırlama

basamağı çok uzun olan, operasyonu sırasında uzman personel gerektiren, kimyasal atık oluşturan ve yüksek maliyetli yöntemlerdir. Şekil 1.1’de NIRS ile RP-HPLC yöntemlerinin şekilsel akış gösterilmektedir.



Şekil 1.1. NIRS ve RP-HPLC yöntemlerinin şekilsel gösterimi

Uzun süreli ve spesifik uzmanlık isteyen vb. dezavantajlara sahip klasik metotların alternatifi olarak tahribatsız, hızlı, güvenilir, doğruluğu yüksek, etkin metotların geliştirilmesi ve uluslararası geçerliliği olacak şekilde yaygınlaştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının sınıflandırılması, un ve makarnada tağışın tespiti, tüketicinin tağış yoluyla aldatılmasını önlenmesi ve üreticiler arası haksız rekabetin önüne geçebilmesi için kemometrik metotlarla kombine edilmiş farklı spektroskopik yöntemlerin performansları araştırılmıştır. Bu bağlamda Raman spektroskopisi (RS), yakın kızılötesi spektroskopisi (Near infrared spectroscopy, NIRS), azaltılmış toplam yansıtma-Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIRS), senkronize floresans spektroskopisi (synchronous fluorescence spectroscopy, SFS) ve lazer indüklü plazma spektroskopisi (Laser induced breakdown spectroscopy, LIBS) kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen spektroskopik verilerin, kromatografik verilerle karşılaştırılması ve doğrulanması için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Reverse-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) kullanılmıştır. Spektroskopik ve kromatografik tekniklerin performansları, temel bileşen analizi (Principal component analysis, PCA), kısmi en küçük kareler-diskriminant analizi (Partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) ve kısmi en küçük kareler-regresyon analizi (Partial least squares regression, PLSR) gibi kemometrik veri işleme teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Makarna ve Makarna Tağşişi

Buğday, tarih boyunca geleneksel olarak dünya çapında üretilen ve tüketilen en temel tarımsal ürünlerden biridir (Oleson, 1994; Beta, 2004). Buğday, insanlık tarihinde medeniyetin gelişimi ve evrimi için çok önemli bir yere sahip olup insanların avcı-toplayıcıyı düzenden yerleşik çiftçilere dönüşmesine yardımcı olmuştur (Eckardt, 2010). Stratejik öneme sahip buğday birçok ürünün ham maddesini oluşturması sebebiyle aynı zamanda gıda sanayisinin temel ürünlerindedir. Bugün bile, buğdayın ucuz ve kolay ulaşılabilir olması insanlar için çok önemli, temel ve evrensel bir gıda kaynağı olmasına neden olmaktadır.

Dünyada iki popüler ve ana buğday cinsi bulunmaktadır. Bunlar *Triticum aestivum* spp. *aestivum* ve *Triticum turgidum* spp. *durum* şeklindedir. *Triticum aestivum* ekmeklik buğday olarak isimlendirilirken, *Triticum durum* ise durum buğdayı, sert buğday veya makarnalık buğday olarak adlandırılmaktadır. Bunlar poliploid türlerdir. *Triticum aestivum*, heksaploid ($6n = 42$) buğday olarak A, B ve D genomlarını içermektedir. *Triticum durum* ise tetraploid ($4n = 28$) buğday olarak A ve B genomlarını içermektedir (Bekes, Gianibelli ve Wrigley, 2004).

Ekmeklik buğday dünya genelinde ekim alanlarının %90'ında ekilip yetiştirilirken, durum buğdayı ekili arazinin sadece %8'sini kaplamaktadır (Paulsen ve Shroyer, 2004). Ekmeklik buğday; yetiştirilme mevsimine göre kış ve yaz, sertliğine göre sert ve yumuşak ile kabuk rengine göre ise kırmızı ve beyaz olacak şekilde sınıflandırılmaktadır (Matsuo, 1994; Anonim, 2019a). Ekmeklik buğdaydan farklı olarak makarnalık buğday için tek bir ana sınıf bulunmaktadır (Matsuo, 1994). Kışlık buğdayın aksine yazlık buğdayın vernalizasyon ihtiyacı bulunmamaktadır. Durum buğdayı ekmeklik buğdaya göre sıcaktan ve susuzluktan daha az etkilenmektedir. Asya kıtasında temel buğday üreticiler Çin, Pakistan ve Hindistan'ken, Kuzey Amerika da başlıca buğday üreticileri Kanada, Amerika ve Meksika'dır. Doğu Avrupa ve Batı Asya'da ise Rusya, Kazakistan, Ukrayna, İran ve Türkiye en önemli buğday

üreticileridir (Paulsen and Shroyer, 2004). Dünya buğday üretiminin %55-60'ı Akdeniz bölgesinden karşılanırken %30 Kuzey Amerika'dan sağlanmaktadır (Sissons, 2004).

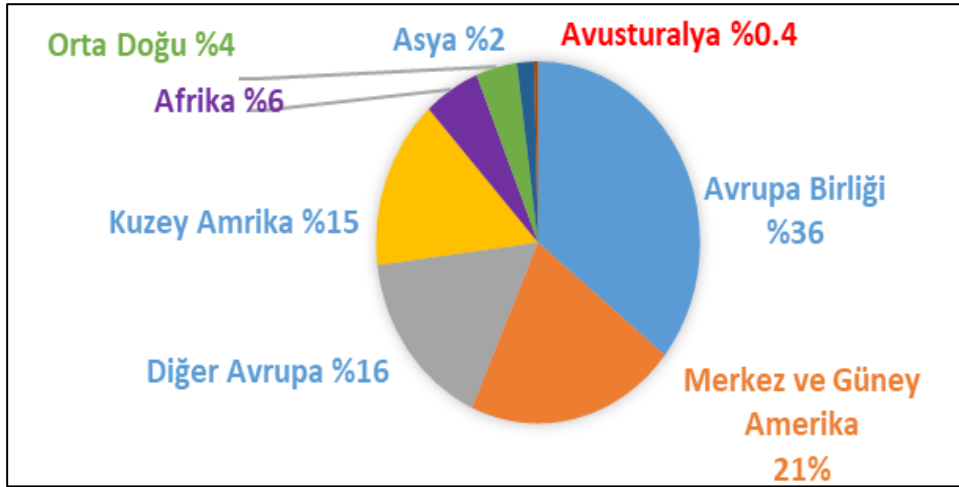
Buğdayın kullanım alanları; tanenin kalitesi, işleme özellikleri, beslenme değeri, tüketici beklentisi, ekonomik kazanç/kayıp ve yasal düzenlemeler gibi bazı faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Sert ekmeklik buğdayın önemli kullanım alanları ekmek, erişte veya hayvan yemi üretimidir. Kurabiyeler, kekler, krakerler ve eriştelere yumuşak ekmeklik buğdaydan üretilirken, makarnalık buğday makarna için kullanılmaktadır (Morris, 2004). Kullanılan değirmene göre buğdayın öğütülmesinden elde edilen ürünler un, irmik/farina, kepek ve rüşeymdir.

Makarna genellikle irmiğe su ilave edilerek üretilen ekstrüde edilmiş bir üründür (Sissons, 2004). Makarna; her ülke için farklı yapım ve pişirme stilleri ile dünya çapında insanın günlük diyetinin en temel, popüler ve geleneksel hububat bazlı gıda ürünlerinden biridir. Makarna, lif ve makro-besinler açısından zengin olmasını yanı sıra düşük glikemik indekse sahiptir (Giacco, Vitale ve Riccardi, 2016). Temel makarna üretim prosesi karıştırma, ekstrüzyon, şekil ve kurutmadır. İlk işlem basamağında 35-40°C'deki su ve irmiğin karıştırılması ile hamur elde edilmektedir. Hamurun su içeriği genellikle %30-32 arasındadır. Makarna hamurunda oksidasyonu azaltmak ve en aza indirmek için vakumlu ekstrüderde basınç altında hamur haline getirilerek şekil verme ünitesine iletilir. Bundan sonraki aşamada, hamur şekillendirilmektedir. Kurutma aşamasında makarna %12.5'lik nihai nem içeriğine ulaşmaya kadar belirli bir sıcaklıkta tutulmaktadır (Morris, 2004; Sissons, 2004). Dünya genelinde yaklaşık 600 farklı makarna şekli olup en popüler olanlar spagetti, fiyonk, yüksük, burgu, kelebek, lazanya, kabuk ve dirsek şekilleridir. Ayrıca makarna kurutulmuş, taze, dondurulmuş ve konserve vb. farklı proses tiplerinde satışa sunulabilmektedir (Sissons, 2004).

Makarnanın tarihi eski medeniyetlere dayanmaktadır. Makarna genellikle İtalyan gıdası olarak bilinmesine rağmen makarnanın ilk kökenlerinin antik Çin'e dayandığı bilinmektedir. 1200'lerin başında İtalyan yemek kitaplarında ilk defa makarnanın tarif edildiği görülmüştür. On altıncı yüzyılda ticaret nedeniyle makarna İtalya'dan Fransa'ya ve diğer Avrupa ülkelerine yayılmıştır. Amerika tarihinde ise ilk kez Kuzey İtalya'ya

seyahat eden Thomas Jefferson tarafından, 1787'de makarna tarifi ve makarna yapma makinesi taslağı hazırlanmıştır. Amerika'daki ilk makarna fabrikası 1848'de Fransız göçmen Antonie Zerega tarafından Brooklyn 'de faaliyete geçirilmiştir. Türkiye'deki ilk makarna fabrikası ise 1922 yılında İzmir'de inşa edilmiştir (Sissons, 2004; Anonim, 2019b; Anonim, 2019c; Anonim, 2019d).

Makarna, lezzetli olmasının yanı sıra mineral ve vitamin yönünden besleyici özellikleri, düşük glisemik indekse sahip olması, uzun süreli depolama kapasitesi, pratik hazırlanması ve ucuz olması sebebiyle geleneksel yeme alışkanlıklarının en önemli bileşenlerinden biridir. Yüksek tüketim oranını karşılık üretim oranı da yüksektir. Dünya makarna üretiminin yüzdesi Şekil 2.1 de gösterilmektedir. Avrupa Birliği ülkeleri dünya genelindeki makarna üretiminin %35.7'sine sahipken, Orta ve Güney Amerika %21'i oranına sahiptir. Kuzey Amerika da ise üretim oranı %15.2'dir.



Şekil 2.1. Dünya makarna üretim yüzdesinin dağılımı (%)

Uluslararası Makarna Organizasyonu'na (International Pasta Organization, IPA) göre, 2015 yılında dünya çapında yaklaşık 14.3 milyon ton makarna üretilmiştir. Avrupa Birliği Makarna Üreticileri Dernekleri'nin (UNAFPA) bildirdiği üzere, aynı yıl Avrupa Birliği'nde 4.6 milyon ton makarna üretilmiş olup İtalya %71 üretim oranıyla Avrupa Birliği'nde en çok makarna üreten ülke olmuştur. İtalya'dan sonra Amerika, makarna üretimi için ikinci ülkedir. İtalya 3.2 milyon ton makarna üretirken Amerika Birleşik

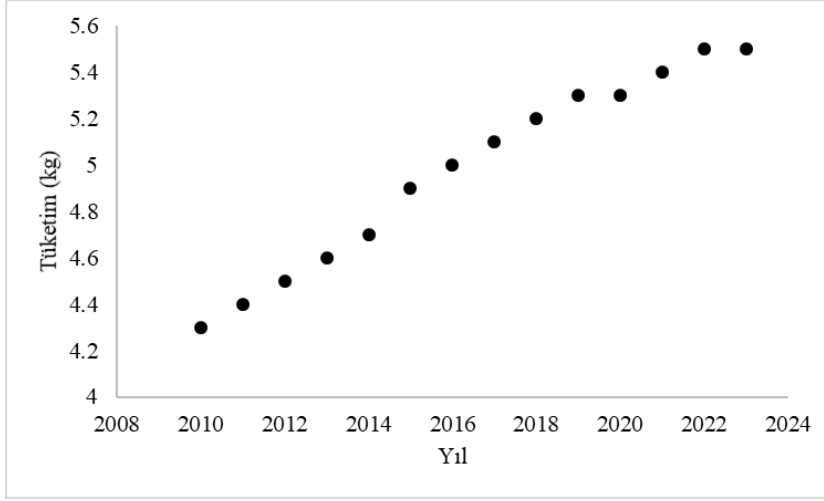
Devletleri (ABD) 2 milyon ton makarna üretmiştir. Türkiye Tarım Ürünleri Sektörü Raporu'na (Ticaret Bakanlığı, 2017) göre, 1994 yılında Türkiye'nin makarna üretimi 406.000 ton iken, 2015 yılında makarna üretimi miktarı ulusal ve uluslararası talepler ile doğru orantılı artış göstererek 1.158.069 ton olmuştur. 2017'de yaklaşık 152 ülke 1.055.670 ton makarnayı Türkiye'den satın almıştır. ABD ve Rusya, Türkiye için iki ana ithalatçı ülke olmuştur. 2019 yılı Comtrade verilerine göre Türkiye dünya makarna ihracatında %6'lık bir payla 4. Sırada yer almaktadır. Türkiye 2019 yılında 144 ülkeye ihracat yapmıştır (Anonim, 2020).

Küresel makarna tüketimi verileri incelendiğinde, ABD 2.7 milyon ton makarna tüketimi ile birinci sıradayken, İtalya 1.507.145 ton ile dünyada ikinci ülkedir. Bununla birlikte, dünyada kg makarna/kişi bazında yapılan bireysel tüketim verilerine göre İtalyanlar en çok makarna tüketicisidir. Bir İtalyan yılda 23.5 kg makarna tüketirken, Amerikalı tüketici 8.8 kg makarna tüketmektedir. Spagetti, ince spagetti, dirsek, makoroni ABD'deki en popüler makarna şekilleridir. Türk makarna tüketicileri ise yaklaşık 7.5 kg makarna/kişi başı tüketmektedir. Makarna dünya çapında bireysel tüketim verileri Çizelge 2.1'de gösterilmektedir. Tüm dünyada makarna tüketimi her geçen gün artmaktadır (IPA, 2013; UNAFPA, 2015; Tarım Ürünleri Sektörü Raporları, 2017; Anonim, 2019d).

Çizelge 2.1. Ülkelere göre 2015 yılı kişi başı makarna tüketim verileri

Ülke	Tüketim (kg/kişi)
İtalya	23.5
Tunus	16.0
Venezuela	12.0
Yunanistan	11.2
İsviçre	9.2
Arjantin	8.8
ABD	8.8
İran	8.5
Şili	8.5
Almanya	8.0
Fransa	8.0
Rusya	7.8
İsveç	7.7
Türkiye	7.5
Macaristan	7.5
Hırvatistan	7.3
Avusturya	7.0
Portekiz	6.6
Kanada	6.5

Şekil 2.2 de, dünyadaki kişi başına ortalama makarna ve erişte tüketimini göstermektedir (Anonim, 2019g). 2019 yılı için kişi başına ortalama makarna ve erişte tüketim miktarı 5.3 kg'dır. Kişi başına düşen makarna ve erişte tüketiminin yıllık olarak artacağı ve 2023 yılında 5.5 kg olacağı varsayılmaktadır.



Şekil 2.2. Yıllık kişi başı ortalama makarna ve erişte tüketimi (kg)

Geleneksel olarak, makarna irmik ve sudan üretilmektedir. Makarnanın bileşenleri tüketici talebi nedeniyle değiştirilebilir, geleneksel olmayan makarnalar ekmeçlik buğday, kinoa, yulaf, arpa, mısır, vb.'den üretilebilir veya peynir, et, sebze, yumurta vb. gibi gıdalar eklenebilir (Morris, 2004; Sissons, 2004).

Yüksek kaliteli bir makarna, kaliteli hammaddelerden üretilmektedir. Geleneksel makarna; zengin bir amber rengi, yüksek protein içeriği, sertlik ve nişasta içeriği vb. gibi bazı karakteristik özellikleri sebebiyle makarnalık buğdaydan elde edilen irmikten üretilmektedir. İrmik, durum buğdayının öğütülmesinden elde edilmektedir (Sissons, 2004). İrmiğin tanecik boyutu undan daha büyük olup (Anonim, 2019e), yaklaşık 130 ila 550 μm 'dir.

İrmik, yumuşak ekmeçlik buğday unu, irmik ve farinadan yapılan makarnaların bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir. İrmiğin, ekmeçlik buğday unundan daha yüksek protein, lipit ve kül içerdiği görülmektedir (Bergman, Gualberto ve Weber, 1994). Durum buğdayı irmiğinin potasyum, magnezyum ve fosfor gibi mineral içeriklerin sert kırmızı yazlık buğday unundan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Matsuo, 1994). Benzer farklılıklar, irmikten ve ekmeçlik buğday unundan yapılan makarnalarda da görülmüştür. İrmikten üretilen makarna, undan üretilen makarnaya

göre daha yüksek renk skoruna ve daha az pişirme kaybına sahiptir (Bergman, Gualberto ve Weber, 1994).

Çizelge 2.2. Farklı hammadde ve makarnaların özellikleri

	Protein (%)	Lipit (%)	Kül (%)	Nem (%)	Renk Skoru	Pişme Kaybı (%)
İrmik	15.46 ± 0.26	1.16 ± 0,03	0.94 ± 0.04	10.77 ± 0.08	-	-
Ekmeklik Buğday Unu	10.72 ± 0.20	1.13 ± 0.04	0.64 ± 0.05	8.73 ± 0.05	-	-
%100 İrmikten Üretilen Makarna	16.02 ± 0.3	0.38 ± 0.00	0.98 ± 0.04	9.74 ± 0.02	6.0	5.3 ± 0.3
%100 Farinadan Üretilen Makarna	10.94 ± 0.25	0.27 ± 0.02	0.65 ± 0.01	7.05 ± 0.15	3.5	10.0 ± 0.1

Makarnalık buğday; yüksek protein içeriği, tekstür, görünüm, tat, sertlik, teknolojik/proses nitelikleri gibi karakteristik kalite özellikleri nedeniyle makarna üretiminde tercih edilmektedir. İrmığın tercih edilmesinin diğer bir önemli sebebi ksantofiller ve lutein içeriği ile ilgili sarı (kehribar) parlak renktir. Makarnalık buğdayın yüksek protein içeriği sayesinde, nişasta granülleri protein ağ yapısı içerisinde muhafaza edilmektedir. Böylelikle durum buğdayı kullanılarak üretilen makarna pişirilirken nişastanın dışarı sızması oldukça düşüktür. Ekmeklik buğdaydan makarna üretildiğinde, pişme sırasında nişasta granüllerinin yüzeyindeki çözünmeyen amiloz-lipit kompleksleri nedeniyle istenmeyen yapışkan makarna formu oluşmaktadır (Matsou, 1994; Morris, 2004; Sissons, 2004). Ekmeklik buğday makarna üretimi için kullanıldığında, genellikle düşük kaliteyi azaltmak ve pişirme kalitesini artırmak için yüksek sıcaklıkta kurutma işlemi uygulanmaktadır (Bergman, Gualberto ve Weber, 1994; Fuad ve Prabhasankar, 2010).

İspanya, ABD ve Kanada gibi bazı ülkeler, %100 makarnalık buğdaydan yapılan makarna hakkında herhangi bir yasal düzenleme yayınlamamış olmasına rağmen tüketiciler genellikle sadece makarnalık buğdaydan üretilen makarnayı tüketmeyi tercih etmektedir (Morris, 2004; Sissons, 2004). Bununla birlikte, Türkiye, İtalya ve Fransa

gibi bazı ülkeler ekmeklik buğdayın makarnada kullanılmasını önleyen yasal düzenlemeler yayınlamıştır.

Türk Gıda Kodeksi'ne (2002) göre makarna, makarnalık buğdaydan üretilen bir ürün olarak tanımlanmaktadır. İtalya'da kurutulmuş makarna sadece durum buğdayından yapılmaktadır (Dell'Interno, 2001). Fransız mevzuatına göre makarna irmik ve sudan üretilmektedir (Alary ve ark. 2002). Avrupa Birliği, öngörülemeyen nedenlerden ötürü makarnanın ekmeklik buğday unu ile %3'e kadar kontamine olmasına izin vermektedir (EU., 1994). Ancak, bazı üreticiler ekmeklik buğdayın ucuz olması nedeniyle makarna üretmek için ekmeklik buğday veya ekmeklik ve durum buğdayı karışımları kullanmakta haksız kazanç sağlamaktadır. Makarnalık buğdayın fiyatı, ekmeklik buğdaydan yaklaşık %25 daha pahalıdır (Righetti ve ark., 2018). Ayrıca Türkiye Makarna Sanayicileri Derneği'ne göre, mısır, mercimek gibi diğer mahsullerin daha yüksek destek politikasına sahip olması nedeniyle makarnalık buğday ekim alanları günden güne küçülmektedir. Durum buğdayının makarna üretimi için en iyi ve en doğru hammadde olduğunun açık olmasına rağmen makarnalık buğdayın yüksek fiyatı ve üretim azlığı, nüfus artışıyla orantılı makarna talebinin artması vb. faktörler makarna üretilirken durum buğdayı dışındaki diğer farklı bileşenlerin kullanılmasına neden olmaktadır.

Ekonomik kaygılar ve makarna tüketimine yönelik artan talebi karşılamak için, makarna üreticileri, makarna yapmak için teknolojik ve duyuşsal özellikleri zayıf olan ekmeklik buğdayları kullanmaktadır (Fuad ve Prabhasankar, 2010). Makarna, etikette belirtilmeden ekmeklik buğdaydan veya ekmeklik buğday ve durum buğdayından oluşan bir karışımdan üretildiğinde, gıda sahtekarlığı ve tağşişisi olarak kabul edilmektedir (Knödler ve ark., 2010; Righetti ve ark., 2018).

Ekonomik motive tağşiş, genellikle üretici ve satıcı için finansal kazancın temel amacı olan gıda taklit ve tağşişinin bir alt kategorisidir. Birçok gıda, ulusal ve uluslararası pazarda potansiyel gıda tağşişisine konu olmaktadır (Sharma ve Paradakar, 2010; Spink ve Moyer, 2011). Gıda tağşişinin önlenmesi ve tüketicilerin korunması için en kritik konu tağşişin hızla tespit edilmesidir. Makarna dünya çapında çok önemli bir besin

olmasının yanı sıra birçok ekonomik sonucu olan önemli bir endüstriyel konudur (Ziegler ve ark., 2016). Makarna; üretimi yasal düzenlemelere tabi olan Türkiye, İtalya ve Fransa gibi bazı ülkelerde tağşişe konu olmakta, bu ülkelerin piyasa ve pazarı için tağşişin tespiti ve tanımlanmasında önem arz etmektedir. Tüketiciyi ve dürüst üreticisini korumak için, ekmeklik ve makarnalık buğdayların sınıflandırılması ve makarna tağşişinin tespiti için literatürde çeşitli klasik yöntemler geliştirilmiş ve yayınlanmıştır.

Elektroforetik ayırma esaslı yöntem, alkolde ekstrakte edilebilir proteinlere bağlı örneklerin ayrılması için kullanılmıştır (Resmini, 1969; García-Olmedo ve García-Faure; 1969). Polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisine dayalı yöntemler ekmeklik buğday ve makarnalık buğday örnekleri arasındaki genetik farklılıklardan yararlanılarak durum buğdayı, ırmik ve makarnada ekmeklik buğday karışımının tespiti için kullanılmıştır (Bryan ve ark., 1998; Terzi ve ark., 2003; Ibrahim ve ark., 2011; Casazza ve ark., 2012). Kromatografik bazlı metotlara örnek olarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (De Noni, De Bernardi ve Pellegrino, 1994), ultra performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon metodolojisi (Russo ve ark., 2014), ultra yüksek performans sıvı kromatografisi dörtlü-uçuş süresi analizi (Rigretti ve ark., 2018), yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi ile alkil-rezorsinol kompozisyonu analizi verilmiştir (Knödler ve ark., 2010).

Tüm bu klasik yöntemler güvenilir ve yüksek doğruluğa sahip olmalarına rağmen, analiz sırasında uzun numune hazırlama aşaması ve uzman personel gerektirmekte, zaman almakta, çözelti/kimyasallara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, bu yöntemlerin yüksek proses maliyetleri olup kullanılan kimyasallara nedeniyle çevre için uygun değildir. Böylece; ekmeklik ve makarnalık buğdayların ayrımının sağlanması ve makarna tağşişinin tespiti konusunda uzun zaman alan ve spesifik uzmanlık gerektiren klasik yöntemlere alternatif olarak yeni, daha hızlı, güvenilir ve yüksek doğrulukta yöntem(lerin) geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

2.2. Spektroskopik Analiz Yöntemleri

Tağışın amacı daha ucuz içerikli ürünler üreterek ekonomik kazanç sağlamaktır. Gıda tağışi gün geçtikçe artma eğilimi göstermektedir. Bu nedenle, tağışi tespit etmek için hızlı, güvenilir, yeni yöntemler geliştirmeye ihtiyaç vardır (Lohumi ve ark., 2015).

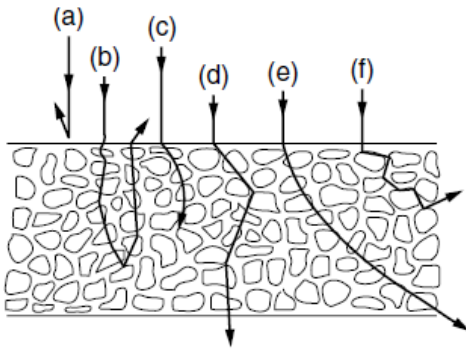
Spektroskopik yöntemler, avantajlarından dolayı klasik yöntemlerin yerini almaktadır. Raman spektroskopisi (RS), yakın kızılötesi spektroskopisi (Near infrared spectroscopy, NIRS), azaltılmış toplam yansıtma-Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIRS), senkronize floresans spektroskopisi (synchronous fluorescence spectroscopy, SFS) ve lazer indüklü plazma spektroskopisi (Laser induced breakdown spectroscopy, LIBS) gıda örneklerinin ayırt edilmesi/sınıflandırılması, gıda tağışinin tespiti ve kökeninin doğrulanmasının araştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Sikorska ve ark., 2005; Cocchi ve ark., 2006; Ucuncuoglu ve ark., 2013, Boyaci ve ark., 2015; Temiz ve ark., 2018; Geniş ve ark., 2019). Ayrıca spektroskopik yöntemler, numunelerin fiziksel özelliklerini analiz eden en hızlı analitik yöntemlerdir. Tüm spektroskopik yöntemler numune ile dalga boyu arasındaki elektromanyetik etkileşime dayanmaktadır (Dufour, 2009).

2.2.1. Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

Kızılötesi (IR) spektroskopisi, bir moleküldeki atomların üst tonları ve titreşimleri üzerine kurulan bir sistemdir ve üç dalga boyu bölgesinden oluşmaktadır: yakın kızılötesi (NIR: 750–2500 nm veya 13333–4000 cm^{-1}), orta kızılötesi (MIR: 2500–25000 nm veya 4000–400 cm^{-1}) ve uzak kızılötesi (25–1000 μm veya 400–10 cm^{-1}) (Lin ve ark., 2009). Kızılötesi radyasyonun dalga boyu (λ), görünür ışığın dalga boyundan daha uzun, mikrodalganın dalga boyundan ise daha kısadır. Kızılötesi ışını mikrodalga ışımına göre daha fazla enerji, frekans ve dalga sayısına sahiptir (Smith, 2011; Rodriguez-Saona, Ayvaz ve Wehling, 2017). Kızılötesi spektrumu, ışığın numuneye aktarımını ölçerek titreşimsel zemin ile uyarılmış durumlar arasında enerji farkını göstermektedir (Schrader, 1995). Infrared spektroskopisinin hızlı, kolay, farklı tipteki numunelerin (katı, sıvı, gaz vb.) analiz edilmesi, duyarlı ve evrensel oluşu avantajlı yönleriyle; titreşime sahip olmayan bazı molekülleri, monoatomik iyonları, tekli

atomları ve su gibi homonükleer diatomik molekülleri tespit edememesi, su içeren örneklerde birtakım önemli sinyallerin oluşumunun maskeleyesi gibi bazı kullanımını sınırlayıcı dezavantajları bulunmaktadır (Smith, 2011).

NIRS, moleküllerdeki atom-atom bağlarının temel titreşim frekansını ölçmeye dayanan titreşim spektroskopisidir. Her atomun üç serbestlik derecesi bulunmaktadır (Schrader, 1995). “n” sayıda atom içeren bir molekülün üç temel koordinatı veya $3n$ derece hareket özgürlüğü vardır: x, y ve z koordinatlarındaki sürekli hareketi (Schrader, 1995). NIR’in radyasyonu örnek ile yansıma, kırılma, soğurma, kırınım ve iletim gibi interaksiyonlar içinde olabilir (Shenk, Workman ve Westerhaus, 2001). Şekil 2.3 görüldüğü üzere NIR radyasyonu örnek içindeki katı parçacıklarla ayna gibi yansıması (speküler reflektans-a), yayılma yansıması (difüz reflaktans-b), absorpsiyon (c), iletim (transmitans-d), kırınım (reflektans-e) ve saçılma (f) etkileşimleri halinde olabilir (Shenk, Workman, and Westerhaus, 2001).



Şekil 2.3. NIR ışınımının çeşitleri

Reflektans (speküler veya difüz), transmitans, interaktans ve transflektans gibi farklı spektral ölçüm modları bulunmaktadır (Lohumi ve ark., 2015). Reflektans modu, numunenin yüzeyinden yansıyan veya saçılan ışığı ölçülmektedir. Katı örneklerin spektral ölçümleri; yansıyan ışığın örneğin içine işleme şiddetine göre speküler ve difüz reflektans olarak gözlenmektedir. Speküler yansıma, radyasyonun bir kısmının, numunenin yüzeyinden yansıtıldığında meydana gelmektedir. Radyasyonun diğer kalan kısmı örneğin yüzeyine nüfuz etmektedir. Numunenin kimyasal ve fiziksel özellikleri genellikle dağınık olarak yansıyan radyasyon ile elde edilmektedir (Lohumi ve ark.,

2015; Rodriguez-Saona, Ayvaz ve Wehling, 2017). İnteraktans modu da katıların spektrumlarını ölçmek için kullanılırken, sıvılar için iletimi ve ince numuneler için transflektans modu kullanılmaktadır (Lohumi ve ark., 2015).

Transmitans ise tüm örneklem metotları içerisinde en basitidir. Geçirgenlik modunda IR ışını doğrudan örnekten geçer ve diğer taraftan tespit edilir. Düşük maliyetlidir. Tüm katı, sıvı ve gaz halindeki numunelerin analizi için uygundur ancak kullanımının sınırlayıcı olması örnek kalınlığına bağlı olmasıdır. Reflektans modundan farklı olarak örnek hazırlaması vakit almaktadır (Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009).

NIR spektrumu sadece gerilim “overtone” içermektedir (Jespersen ve Munck, 2009). NIR spektrumundaki temel overtone bantları, majör moleküler bağlar hakkında bilgi vermektedir. O-H, C-H, S-H ve N-H gibi X-H molekül bağları ve C=O ve C-C gibi yüksek titreşimli bağlar NIR bölgesinde yüksek frekanslı overtone ve kombine bantları oluşturmaktadır (Law ve Tkachuk, 1977; Ciurczak, 2001; Shenk, Workman ve Westerhaus, 2001). Bir bant temel frekansı iki ila üç katı frekansta üretilebilir (Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009). NIR bantları kimyasal bağların kompleks titreşim hareketi sonucu oluşur ve harmoniden (uyumdan) sapma eğilimi gösterir. Bu sapma (uyumsuzluk) temel titreşim frekansının iki (1.overtone), üç (2.overtone) veya daha yüksek enerji seviyelerinden ($12.500-4.000 \text{ cm}^{-1} - 1.800-2.500 \text{ nm}$) kaynaklanan bantlarla sonuçlanmaktadır. NIR bantları MIR’in temel bantları ile kıyaslandığında 10-100 defa daha az yoğundur (Rodriguez-Saona, ve Allendorf, 2011). NIR spektrumu, numunenin parmak izi hakkında bilgi vermektedir (Cen ve He, 2007). Parmak izi bölgesi maddeye has ve özgü bilgi vermektedir.

NIRS cihazının temel bileşenleri ışık kaynağı, monokromatör/ışın ayırıcı sistemi, örnek tutucu, dedektör, optik sistem ve bilgisayardır. NIRS’in radyasyon kaynağı genellikle tungsten halojen lambalarıdır. Tungsten halojen lambanın yanı sıra, lazer emisyon diyotu (LED) da NIR'in ışık kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak LED, yüksek fiyatı nedeniyle tungsten halojen lamba kadar popüler değildir (Cen ve He, 2007; Lin ve ark., 2009). Monokromatör, dalga boyu seçim cihazı olarak ışığı ayırma mekanizmasıdır. Geniş dalga boyu aralığını ışık filtresi gibi tek renkli ışığa dönüştürmektedir. NIR

dedektörü ışığın yoğunluğunu algılayarak ışığı elektrik sinyaline dönüştürmektedir. NIR dedektörlerinin seçimi, ölçülecek dalga boyu aralığına bağlıdır. NIR sisteminde genellikle fotodedektör kullanılmaktadır. NIR sisteminin son bileşeni bilgisayardır. Bilgisayar spektral verileri işlemektedir (Lin ve ark., 2009).

NIRS, ön-işlemsiz ve tahribatsız bir şekilde ölçüme olanak sağlaması nedeniyle gıda endüstrisinde gıda bileşenlerini analiz etmek, gıda kalitesini belirlemek, gıdaları sınıflandırmak ve gıda taşımasının tespiti için son yıllarda rutin olarak kullanılmaktadır. Gıda analizinde NIRS uygulaması için; ilk olarak spektral veriler toplanır, gürültü ve baseline kayması elimine edilerek ön veri işleme aşamasına tabi tutulur. Ardından, bilinen örneklerle kalibrasyon modeli oluşturulur ve bilinmeyen örneklerle validasyon seti oluşturulur ve modelin performansı test edilir (Cen ve He, 2007).

NIRS uygulaması kalitatif ve kantitatif analizler için yararlı bir enstrümandır (Porep, Kammerer ve Carle, 2015). NIRS; hammadde, ara ürün ve son ürünün kalitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Unlu mamüllerin protein, nem, nişastası, kül, renk, su absorpsiyonu, partikül büyüklüğü gibi kalite parametreleri NIR ile belirlenmektedir (Osborne, 2001). Un, hamur, ekmek, bisküvi, makarna, diğer tahıl türlerinin nem, protein, sertlik, lif gibi kalite parametrelerini belirlemek için hızlı sonuç elde edilen NIR tekniğinden yararlanılmaktadır (Bertrand ve ark. 1996; Mutlu ve ark., 2011). Süt, süt tozu, peynir, tereyağı ve diğer süt ürünlerinin ana bileşeni NIR ile analiz edilmektedir (Frankhuizen, 2001).

Kalite analizine ek olarak, NIRS ayrıca buğdayın sınıflandırılması, tanımlanması, ayırt edilmesi veya menşeinin bulunması için de kullanılmaktadır (Bertrand ve ark., 1985; Delwiche, Chen ve Hruschka, 1995; Miralbe's, 2008). Sert kırmızı kışlık ve sert kırmızı yazlık buğday örnekleri NIRS ile %91-98 doğruluk oranıyla sınıflandırılmıştır (Delwiche, Chen ve Hruschka, 1995). Ayrıca, NIR buğday öğütme özelliklerinin tahmininde kullanılma imkanları araştırılmış, sadece irmik ekstraksiyonu için bir kullanım potansiyeli olduğu bulunmuştur (Blazek, Jirsa ve Hruskova, 2005). Kemometrik yöntemlerle kombine edilmiş NIR, 249 buğday örneğinin ayırt edilmesinde kullanılmış, tahribatsız ve hızlı bir teknik olarak buğdayın

sınıflandırılmasında rutin olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Miralbés, 2008). Diğer bir çalışmada coğrafi kökenlerine göre buğdayları ayırt etmek amacıyla buğday tanesi ve tam buğday unu, NIR kullanılarak analiz edilmiştir ve NIRS umut vaat etmiştir (Zhao ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, antik (spelt, emmer, einkorn) ve modern (ekmeklik ve durum) buğday türlerinin ayırımında endüstriyel spektrometre ve laboratuvar ölçekli FT-NIR spektrometresi test edilmiştir. Endüstriyel spektrometre, beş buğday türünün sınıflandırılmasında laboratuvar FT-NIR spektrometresinden daha yüksek doğruluğa sahip olduğu görülmüştür. PLS-DA ile kombine edilmiş endüstriyel NIR spektroskopisi kullanıldığında 60 makarnalık buğday örneğinden 3'ü yanlış sınıflandırılırken, 60 ekmeklik buğday örneğinden 52'si doğru bir şekilde sınıflandırılmıştır. Laboratuvar ölçekli FT-NIR spektrometresi kullanıldığında ise 73 buğday örneğinin yanlış sınıflandırıldığı görülmüştür (Ziegler ve ark., 2016).

Ayrıca, NIRS kullanılarak gıda tağışını saptamaya yönelik çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Ekstra sızma zeytinyağında pirina yağı ilavesinin belirlenmesi (Yang ve Irudayaraj, 2001), safradaki krosinlerin tayin edilmesi (Li ve ark., 2018), karabiber ve kimyon karışımlarının (De Lima ve ark., 2020) ve siyah çayın doğrulanması (Firmani ve ark., 2019), unlu mamullerdeki yağ tağışının tespitinde (Ucuncuoglu ve ark., 2013) NIR başarılı şekilde kullanılmıştır. Yoğurt tağışında ise saf yoğurtlar farklı seviyelerde ilave edilen yenilebilir jelatin, endüstriyel jelatin ve soya proteini tozunun NIRS ile güvenli bir şekilde tespit edildiği bulunmuştur (Xu ve ark., 2013). NIR spektroskopisi makarnalık buğday unundaki ekmeklik buğday ununu tespit etmek için kullanılmıştır (Cocchi ve ark. 2006). NIRS; kalite, sınıflandırma ve tağış analizlerinde endüstriyel ve bilimsel uygulamaların gereksinimlerini karşılamaktadır.

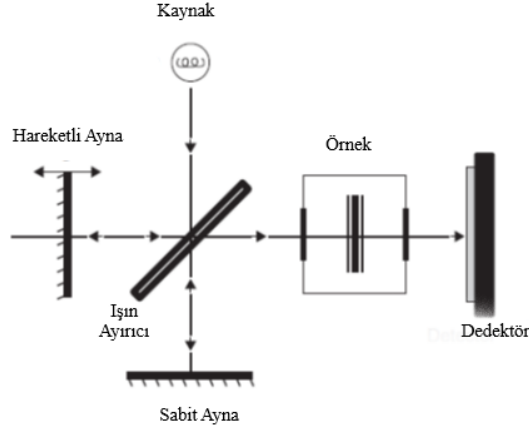
2.2.2. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIRS) ile, NIR bölgesinde ölçülen overtonlar ve kombinasyon bantları yerine moleküllerin temel titreşim ve rotasyonel gerilme modları ölçülmektedir (Lohumi ve ark., 2015). Daha yüksek çözünürlüğe sahip olan FTIRS, yüzlerce spektral veri noktası içeren NIR'ın aksine binlerce veri noktası içermektedir (McCarthy ve Kemeny, 2001). FTIR spektroskopisi, azaltılmış toplam yansıtma (ATR), difüz yansıtma, yüksek verimli iletim ve iletim hücresi gibi ölçüm

modları ile her türlü gıda maddesi (katı, sıvı veya gaz) için kullanılabilir. Gıda analizleri için daha uygun olan ATR modu, bir dahili yansıma elemanı veya kristal yoluyla IR ışınının toplam dahili yansıtmasına dayanmaktadır (Cocciardi, 2003; Lohumi ve ark., 2015). ATR son yıllarda kullanılan en popüler reflektans tekniklerinden biridir. IR ışını yüksek kırılma indisi alandan (kristal) düşük kırılma indisi ortamına (örnek) geçtiğinde ışığın bir kısmının düşük kırılma indisi ortamına geri yansıtılma durumuna toplam iç yansıma denilmektedir. Bu durumda ışık enerjisinin bir kısmı yüksek kırılma indisi bölgesinden kaçar ve yüzeyden uzaklaşır. Bu dalgalar görünmez olur ve kaybolan dalgalar olarak ifade edilmektedir. Bu durumda yansıyan ışığın yoğunluğu azalmaktadır ve buna azaltılmış toplam yansıma (ATR) denilmektedir (Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009). Çeşitli ATR kristalleri mevcuttur, yaygın kullanılan kristallerin bazı örnekleri çinko selenid, talyum-iyodür, talyum-bromür, germanyum, silikon ve elmadır. Karakteristik özellikleri spektral aralık, sertlik, pH aralığı vb. bağlı olarak değişmektedir (Rodriguez-Saona, Ayvaz ve Wehling, 2017).

ATR-FTIR cihazının ana bileşeni IR kaynağı, lazer, ışın ayırıcı, sabit ve hareketli ayna sistemi, dönüştürücü, dedektör ve bilgisayardır. Işın ayırıcı, IR ışığını ikiye böler ve ışınlar aynalardan geçer. Aynalardan geri yansıyan ışınlar, ışın ayırıcısına geri yansıtılır. Yeniden birleşmiş ışın numuneden geçerek dedektörler tarafından algılanmaktadır. Son yıllarda IR kaynağı olarak seramik veya nikrom telden yapılmış kaynaklar kullanılmaktadır. Lazer IR ışık kaynağı olmayıp hareketli aynanın konumunu ve sıfır yol noktasını belirlemek amacıyla FTIR cihazlarında bulunmaktadır. Modern FTIR cihazlarında lazer olarak Helyum-Neon lazeri kullanılmaktadır. En sık kullanılan dedektörler ise döteryumlanmış triglisin sülfat ve cıva kadmiyum tellür dedektörleridir. Dedektörler bir enerji formunu (ışık) başka bir enerji formuna (elektriksel uyarılar) dönüştürür. Bir monokromatöre alternatif olarak, cihazın bir interferometresi vardır. İnterferometre ışın ayırıcı ile hareketli ve sabit ayna düzeneğidir, iki ışık demeti arasındaki girişim modelini ölçer ve FTIR cihazının kalbidir. Şekil 2.4 de interferometre gösterilmiştir. Girişimölçer (interferometre) kullanılarak interferogram elde edilmektedir. Bir interferogram, iki ışının optik yol farkı ile oluşmaktadır. İnterferogram sıfır yol farkı noktası ve başlangıç konumundaki geri hareket noktası arasındaki aynanın hareketini temsil etmektedir. Fourier dönüştürücü, interferogramı spektruma dönüştürür. Kısaca Fourier dönüşümü, optik yol farkına karşı kızılötesi yoğunluk olarak kaydedilen

bir sinyali (interferogram), dalga boyuna göre yoğunluğu (spektrum) gösteren bir grafik haline getirmektedir. FTIR spektrumu $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyundadır (McCarthy ve Kemeny, 2001; Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009; Smith, 2011).



Şekil 2.4. Michelson İnterferometre Diyagramı

(Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009)

FTIR spektroskopisinin diğer kızılötesi spektrometrelere göre en önemli avantajlarından biri, spektrumları yüksek sinyal-gürültü oranlarıyla ölçme kabiliyetidir. Sinyal-gürültü oranı pik noktasının kalitesinin bir ölçüsüdür ve sinyalin gürültüye bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Gürültü değerini ölçmenin en kolay yolu pikten pike gürültüyü ölçmektir. FTIR'ın diğer avantajları ise daha yoğun tarama yapması ile spektral kaliteyi arttırmakta, dalga sayısı hassasiyeti ile orantılı olarak tekrarlanabilirliğinin yüksek olmasıdır (Smith, 2011).

FTIR cihazının kullanılmasında bazı sınırlamalar mevcuttur. En önemli dezavantajı monoatomik iyonları, elementleri ve helyum ve argon gibi inert gazları, N_2 , O_2 gibi diatomik molekülleri tespit edememesidir. Ayrıca güçlü absorpsiyon bandı oluşturan su içeriği önemli sinyallerin oluşumunu maskeleyebilir (Subramanian ve Rodriguez-Saona, 2009).

ATR-FTIRS; hızlı, tahribatsız, düşük maliyetli olma gibi özellikleri sayesinde diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Nunes ve ark., 2016). Bu nedenlerle ATR-FTIRS,

gıda maddelerinin kalite parametrelerinin analizi, coğrafik kökeninin bulunması, sınıflandırılması, tağşişinin tespit edilmesi gibi gıda araştırmalarında kullanılmaktadır. ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak balın farklı botanik kökenlerini bulunması (Gok ve ark., 2015), yemeklik bitkisel yağların sınıflandırılması (Jiménez-Carvelo ve ark., 2017), farklı coğrafî bölge ballarında yapay şekerin analizi (Wang ve ark., 2010), sütteki melamin seviyesinin tespiti (Jawaid ve ark., 2013), inek sütünde formalin tespiti ve miktar tayini (Balan ve ark., 2020) gibi çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca ATR-FTIR spektroskopisi, numunenin moleküler yapısı ve ürün kalitesi hakkında bilgi sağlamaktadır (Liu ve ark., 2015; Er ve ark., 2017). FT-NIRS kullanılarak buğday sertliğinin ve tam buğday ununun protein ve nem içeriğinin belirlenmesi başarılı ile sağlanmıştır (Manley, Van Zyl ve Osborne, 2002). Buğday, spelt, çavdar ve tritikale un örneklerinin proteinler, yağ, kül, nem, düşme sayısı, yağ asidi bileşenleri vb. kalite parametrelerinin analizi klasik metot ve FT-MIR ile gerçekleştirilmiş ve klasik metot ve FT-MIRS'den elde edilmiş protein, yağ ve kül içeriğindeki sonuçlar arasında doğrusal korelasyon olduğu görülmüştür (Sujka ve ark., 2017).

Sirkelerinin kalite ve otansitesi karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında ATR-FTIRS'ın potansiyeli araştırılmış, yüksek kaliteli şarap sirkelerinin karakterizasyonu için uygun olduğu kanıtlamıştır (Ríos-Reina ve ark., 2017).

Kalite analizlerinin yanı sıra gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla FTIRS'dan yararlanılmaktadır. Ekmeklik ve makarnalık buğdaydaki deoksinivalenolün hızlı analizi için FT-NIRS kullanılmış ve Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen işlenmemiş buğdayda izin verilen maksimum sınırların çok altındaki seviyelerde deoksinivalenol tespit edilmiştir (De Girolamo ve ark., 2009). Bunların yanı sıra literatürde ATR-FTIRS kullanılarak tağşişi tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmalara örnek olarak etteki (Nunes ve ark., 2016), soğuk preslenmiş susam yağındaki (Ozulku ve ark., 2017), soğuk preslenmiş buğday rüşeym yağındaki (Arslan ve Çağlar, 2019), baldaki (Cengiz ve Durak, 2019), safrandaki (Er ve ark., 2017), kinoa unundaki (Rodríguez, Rolandelli and Buera, 2019) ve tarçın tozundaki (Yasmin ve ark., 2019) araştırmalar gösterilebilir. Kemometri ile kombine edilen FTIR ve senkronize floresans spektroskopisi ceviz

yağına karıştırılan soya fasulyesi yağının taşımasını belirleme oranı karşılaştırıldığında FTIR'ın %10 taşıma ve SFS'nin %5 taşıma oranını tespit ettiği bulunmuştur (Li ve ark., 2015). Farklı ekstraksiyon oranlarındaki (%72, %82 ve tam buğday) sert ekmeklik buğday unu ve makarnalık buğday unu ile bunlar kullanılarak üretilen makarna FTIRS kullanılarak analiz edilmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğdaylar ve ürünleri lipit, karbonhidrat ve protein gibi farklı polar fonksiyonel gruplar içerdiğinden, FTIR spektroskopisi ile makarnanın taşımasının tespit edilmesinde başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür (Kamil ve ark., 2011).

2.2.3. Senkronize Floresans Spektroskopisi

Floresans Spektroskopisi incelendiğinde ise diğer spektroskopik yöntemler gibi floresans spektroskopisi tekniği numunenin parmak izi hakkında bilgi vermektedir. Tahribatsız bir şekilde gıdanın karakterizasyonu, kalitesinin değerlendirilmesi ve bileşenlerinin analizinde kullanılmaktadır. Absorpsiyon tekniklerine göre daha yüksek hassasiyeti ve seçiciliği vardır. UV veya görünür radyasyon tarafından elektronik olarak uyarılan bazı moleküller hareketli duruma yükselmektedir. Uyarılmış enerji düzeyindeki molekül, foton emisyonu ile temel enerji durumuna geri döner, bu durum fotoluminesans olarak adlandırılır. İki tip fotoluminesans bulunmaktadır: floresans ve fosforesans. Moleküllerin çoğu oda sıcaklığında en düşük enerji seviyesinde olup fotonun emilimi ile moleküller daha yüksek uyarılmış enerji seviyesine ulaşırlar. Molekül, titreşimsel gevşeme ile başlangıç enerjisine dönmeye çalışmaktadır. Temel singlet halden uyarılmış singlet hale ulaşan uyarılmış molekülün başlangıç seviyesine dönmesi floresans olarak adlandırılmaktadır. Uyarılmış triplet halden temel enerjiye dönmesi ise fosforesans olarak ifade edilmektedir. Fosforesans spektroskopisinin uygulama alanı floresans spektroskopisinin uygulama alanına göre daha sınırlıdır. Floresans spektrumu absorpsiyon spektrumu ile kıyaslandığında daha yüksek dalga boyu ve daha düşük enerji seviyesine sahiptir. Bunun nedeni uyarılmış durumun titreşimsel gevşemesi sırasında emilen enerjinin bir kısmının kaybolmasıdır. Floresans karakteristiği, molekülün pozisyonundan ve doğasından etkilenmektedir.

Genel olarak Floresans Spektroskopisi UV-görünür radyasyonu yayan ışık kaynağı, uyarma dalga boyu seçicisi (uyarılma monokromatörü), numune bölmesi, emisyon

dalga boyu seçicisi (emisyon monokromatörü) ve dedektör sisteminden oluşmaktadır. Işık kaynağı genel olarak 200 ila 900 nm arasında geniş bir spektral aralıkta yayılım yapmaktadır. İki monokromatör, kaydedilen spektrumun tipine bağlı olarak taranmaktadır, emisyon (emisyon spektrumu) veya uyarma (uyarma spektrumu) veya her ikisi de (senkronize floresans spektrumu) olacak şekilde kaydedilmektedir. Kısaca, Floresans spektroskopisi iki spektrumu emisyon ve uyarma spektrumu içermektedir. Emisyon spektrumu, numune sabit bir dalga boyunda (λ uyarılma) uyarıldığında, emisyon dalga boyunun (λ emisyon) bir fonksiyonu olarak emisyon yoğunluğunun kaydedilmesiyle oluşmaktadır. Başka bir deyişle belirli bir uyarma dalga boyunda, emisyon monokromatörünün çeşitli emisyon dalga boylarında taranmasıyla emisyon spektrumu elde edilmektedir. Sabit emisyon dalga boyunda (λ emisyon), uyarılma monokromatörünün taramasıyla çeşitli uyarılma dalga boyu ile uyarma spektrumu ortaya çıkmaktadır (Patra ve Mishra, 2002; Sádecká and Tóthová, 2007; Sikorska, Khmelinskii ve Sikorski, 2019). Emisyon spektrumu, uyarılma radyasyonunun dalga boyu sabit tutularak sağlanırken uyarılma spektrumu emisyon monokromatörü sabit bir dalga boyundayken kaydedilmektedir. Emisyon spektrumunda florofor absorpsiyon bandının maksimumundayken, uyarma spektrumunda ise floroforun emisyon bandı maksimumdadır. Bileşenler sadece foton absorbe ettikten sonra floresans yayabilir. Böylelikle spektrumda bileşen tarafından absorbe edilen ışığın dalga boyu tanımlanmaktadır. Tekli floroforik sistemlerde emisyon ve uyarma spektrallerin pozisyonu ve şekilleri emisyon ve uyarılma dalga boylarından bağımsızdır. Ancak çoklu sistemlerde örneğin gıda matrislerinde genellikle üst üste binen absorpsiyon ve emisyon spektrumlarını içeren floroforlar bulunmaktadır. Bu karışıklığı gidermek için üç tane floresans tekniği geliştirilmiştir. Bunlar uyarma-emisyon matrisi floresans spektroskopisi, senkronize floresans spektroskopisi (SFS) ve toplam senkronize floresans spektroskopisidir (Sikorska, Khmelinskii ve Sikorski, 2019). Senkronize Floresans Spektroskopisi (SFS), emisyon ve uyarma dalga boylarını taramak için yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip bir tekniktir (Patra ve Mishra, 2002). Emisyon ve uyarma dalga boyları arasında sabit dalga boyu aralığı korunmaktadır (Patra ve Mishra, 2002; Poulli, Mousdis ve Georgiou, 2006).

Geleneksel floresans spektrumun geniş bantlı örtüşme problemi, senkronize floresans taramasının gelişmiş seçicilik özelliği sayesinde ile aşılmaktadır. SFS uyarma ve

emisyon monokromotörünün aynı anda taramasını içermektedir. SFS genellikle sabit bir dalga boyu aralığında ($\Delta\lambda = \Delta\lambda_{em} - \Delta\lambda_{uy}$); $\Delta\lambda$ emisyon ve $\Delta\lambda$ uyarılması eş zamanlı (senkronize) olarak taranması ve sürdürülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Bu mod en basit ve yaygın tekniktir ve sabit dalga boyu olarak bilinmektedir. Emisyon ve uyarma spektrumundan farklı olarak SFS profili $\Delta\lambda$ nın fonksiyonu olarak değişmektedir. Gıda analizlerinde sabit dalga boyunda ($\Delta\lambda$ emisyon- $\Delta\lambda$ uyarılma) ölçümler gerçekleştirilmektedir (Patra ve Mishra, 2002; Sádecká and Tóthová, 2007; Sikorska, Khmelinskii ve Sikorski, 2019). Şekil 2.5'te görüldüğü üzere bir molekül A1, A2, ..., A9 dalga boyundan başlayarak tüm absorpsiyon bantlarında uyarılabilir, F1, F2,...F9 dalga boyunda floresans verebilir. Floresans emisyon spektrumu elde edilmesi için moleküller genellikle maksimum absorpsiyon (A5) enerji seviyesinde uyarılır ve tüm emisyon dalga boylarında (F1, F2, F3, ..., F9) veri toplanır. Floresans uyarma spektrumu elde edilirken ise moleküller tüm uyarma dalga boylarında (A1, A2, A3,, ...A9) uyarılır ve floresansın maksimum emisyon (F5) seviyesindeyken veriler toplanır. Ancak SFS de belirli bir dalga boyu aralığı seçilir, böylece uyarma ve emisyon bantları arasındaki aralığın ($\Delta\lambda$) eşleştiğinde sinyal gözlemlenir (Patra ve Mishra, 2002).



Şekil 2.5. Senkronize floresans taraması

Floresans spektroskopisinin bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Floresans spektrumları tipik olarak tüm numune bileşenlerinin kimyasal, fiziksel ve yapısal

bilgilerini içeren geniş floresans bantlarına sahiptir. Spektradaki analitik bilgiler doğası gereği değişkendir ve bu nedenle çok seçici değildir. Ayrıca spektrodaki farklılıkların küçük olması nedeniyle numuneler arasındaki farklılıkların ayırt edilmesinde çeşitli zorluklarla karşılaşılabilir (Sádecká and Tóthová, 2007). Çok bileşenli örneklerin çok fazla sayıda uyarma ve emisyon spektrumlarının çakışma problemi olması nedeniyle geleneksel floresans spektroskopisinin kullanılması sınırlanmaktadır. SFS spektrum çakışmasını en aza indirmektedir. Geleneksel floresans spektroskopisi ile karşılaştırıldığında SFS daha keskin ve dar spektrum piklerine sahiptir (Patra ve Mishra, 2002). SFS kullanmanın iki önemli avantajı bulunmaktadır. SFS tüm floresans aralığını dikkate alması ve tek bir florofora özgü olan klasik bir emisyon spektrumuna kıyasla çeşitli floroforlarla ilgili bilgileri göstermektedir. Senkronize floresans spektrumu sabit bir dalga boyu aralığı tutarak hem uyarma hem de emisyon monokromatörlerini aynı anda tarayarak elde edilmektedir (Karoui ve Blecker, 2011).

Son yıllarda gıda örneklerinin sınıflandırılması için konvansiyonel, uyarma-emisyon matrisi ve senkronize floresans spektroskopisi gibi çeşitli floresans teknikleri; temel bileşen analizi, hiyerarşik küme analizi, paralel faktör analizi ve faktöriyel ayrımcılık analizi gibi farklı kemometrik yöntemlerle kombine edilerek hızlı, tahribatsız ve hassas olması nedeniyle tercih edilmektedir (Sádecká and Tóthová, 2007).

Palmiye ve hindistancevizi yağları ile tereyağı karışımının saptanması için floresans spektroskopisinin potansiyeli araştırılmıştır. 60 nm dalga boyunda %5.5 tespit limit ile tağışın tespit edildiği görülmüştür (Dankowska, Małeczka ve Kowalewski, 2014). Başka bir çalışmada 250-600 nm aralığın da 20, 40, 60 ve 80 nm dalga boyu aralıklarıyla ayçiçek yağı ilave edilmiş tahinde tağışın tespiti için üç farklı kemometrik yöntemle kombine edilmiş SFS verileri kullanılmıştır. Uyarma ve emisyon monokromatörlerinin taranmasıyla veriler toplanmıştır. En düşük tağış limitinin tespit değeri PLS ile kombine edilmiş 40 ve 80 nm dalga boyundan elde edilmiştir (Temiz ve ark., 2017). Sızma zeytinyağında ayçiçek yağının tanımlanması toplam senkronize floresans spektrumu ile ayırma potansiyeli incelenmiş ve %3.4 seviyesinden fazla olan tağış oranının tespit edildiği görülmüştür (Poulli, Mousdis ve Georgiou, 2006). Toplam lüminesans ve senkronize tarama floresans spektroskopisi teknikleri; soya fasulyesi,

ayçiçeği, kolza tohumu, yarfıstığı, zeytin, üzüm çekirdeği, keten tohumu ve mısır yağları gibi yenilebilir yağları karakterize etmek ve sınıflandırmak amacıyla kullanılmıştır. Her iki yöntemde de, düşük sınıflandırma hatası ile yağlar arasında çok iyi bir ayırım sağlamıştır. Tokoferollere, klorofillere ve tanımlanamayan flüoresan bileşenlere atfedilen bantlar SFS spektrumlarında tespit edilmiştir. Yağların SFS spektrumlarının spektral profilleri, yağ numuneleri arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. (Sikorska ve ark., 2005). Başka bir çalışmada natürel sızma zeytinyağındaki ısıl işlemin etkileri araştırılmıştır. 20 nm dalga boyunda 250-720 nm aralığında 75°C de 8 saat bekletilen yağların spektrumları 25°C oda sıcaklığında bekletilen yağların spektrumuyla karşılaştırıldığında belirgin spektrum farklılıkları görülmüştür. Ayrıca natürel zeytinyağı ile rafine zeytinyağı karışımında %2 tağış seviyesini tespit etmek mümkün olmuştur (Mabood ve ark., 2016).

Şeker kamışı şurubu ile balın floresans spektroskopisindeki analizinde senkronize lümineans spektrumlarında farklılık olduğu görülmüştür. Farklılığın temel sebebi balın floresansını flavinlerin domine ettiği, şeker kamışında ise nikotinamid adenin dinükleotidin katkı sağladığı görülmüştür (Ghosh ve ark., 2005). Biralarda depolama kaynaklı kimyasal bileşimindeki değişiklikleri incelemek için SFS kullanılmıştır. PCA analizi ile 10 nm ile 60 nm dalga boyunda biralarda saklama koşullarına göre net bir kümeleşme olduğu gözlenmiştir (Sikorska ve ark., 2006).

Fermente süt ürünlerinde inek, manda, keçi ve koyun sütü türlerin tespiti için bir çalışma yapılmıştır. Bu amaçla saf türlerden ve karışımlardan üretilen yoğurt ve peynir örnekleri için PLS-DA ile kombine edilmiş SFS verilerinde yüksek seçicilik ve spesifikte kümeleşme olduğu gözlenmiştir. Tağış yapılmış yoğurt ve peynir numuneleri için kullanılan PLS modellerinde de, tağış tespit sınırının %3.3'ün altında olduğu bulunmuştur (Genis ve ark., 2019). Sert peynir üretimi sırasında bitkisel yağ ilavesi tağışının tespit edilmesi amacıyla SFS kullanılmıştır. 240-700 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Dalga boyu 60 nm ve 80 nm de tağışın en düşük tespit limitinin %3 ve %4.4 olduğu bulunmuş ve SFS'nin tağış tespit etmede başarılı bir potansiyeli olduğu görülmüştür (Dankowska, Małecka ve Kowalewski, 2015).

Buğday ununun protein, yaş gluten ve sedimentasyon değerleri gibi un kalite parametreleri, hamurun gelişme süresi ve su absorpsiyonu gibi reolojik özellikleri ile ekmekteki nem içeriği ve ekmek hacmi gibi kalite parametrelerinin tespitinde hızlı bir yöntem olarak floresans spektroskopisinin kullanılma potansiyelinin olduğu bulunmuştur (Ahmad ve ark., 2016). Buğday, mısır, çavdar, karabuğday, pirinç ve arpa sınıflandırılması için senkronize floresans spektroskopisi kullanılmıştır. Sabit dalga boyu modunda kaydedilen toplam senkronize floresans spektrumlarında, doğal florofor konsantrasyonlarındaki farklılıklar nedeniyle unun çeşidine göre net farklılıklar görülmüştür. Ayrıca 7 ve 20 nm senkron aralığında PCA, kümeleme analizi, PLS-DA analizleri ile farklı un tiplerine göre ölçüm verilerinin ayrıldığı görülmüştür (Zekovic ve ark., 2012).

Ön yüz floresans spektroskopisi ile, farklı buğday çeşitlerinin farklı proses koşullarındaki (tane, un, irmik ve makarna) ayrılma potansiyeli araştırılmıştır. Horasan buğdayı (*Triticum turgidum*), ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) ve makarnalık buğdaydan (*Triticum durum*) üretilen un, irmik ve makarna örneklerinin 290 nm uyarma dalgaboyunda 305-400 nm arasındaki triptofan floresans spektrumları incelenmiştir. Veriler incelendiğinde Horasan buğdayından üretilen tam buğday unu ve rafine buğday unu örneklerinin, ekmeklik buğdaydan üretilen tam buğday unu ve rafine buğday unu örneklerinden farklı bir şekilde kümeleştiği görülmüştür. Makarna örnekleri incelendiğinde Horasan tam buğday unu ve ekmeklik tam buğday unundan üretilen makarnaların, rafine ekmeklik buğday unu ve rafine Horasan buğday unundan üretilen makarnalardan ayrıldığı görülmüştür. Un ve irmik örneklerinin sınıflandırma yüzdesi %86.7 ile %87.9 iken, makarna örneklerinin sınıflandırma yüzdesinin %61.9 olduğu bulunmuştur. En iyi ayrımın irmik formundaki örneklerde olduğu görülmüştür (Karoui, Cartaud ve Dufour, 2006).

2.2.4. Raman Spektroskopisi

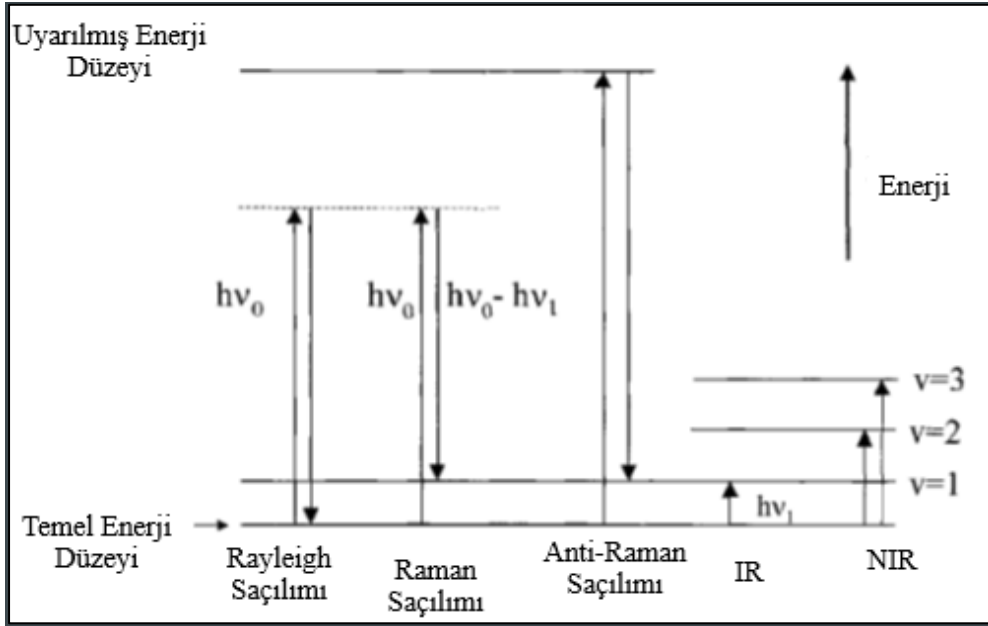
Kızılötesi Spektroskopisi gibi Raman Spektroskopisi de titreşim spektroskopisi olarak sınıflandırılmaktadır (Schrader, 1995). Raman spektroskopisi molekül yapısının anlaşılması için karakteristik temel titreşim sağlamaktadır. Titreşim spektroskopileri çok geniş yelpazedeki örnek türlerinin kalitatif ve kantitatif analizleri için tam spektrumlu

ve derinlemesine analiz yapabilen cihazlardır. Raman spektroskopisi katı, sıvı, gaz vb. çok çeşitli fiziksel hallerde ve sıcaklıklarda, mikroskobik ya da çok miktarda örneğin analizine olanak sağlamaktadır. Raman spektroskopisi polar olmayan grupların simetrik vibrasyonunda iyiyken, IR spektroskopisi polar grupların asimetrik vibrasyonunu ölçmede iyidir. Raman ve IR spektroskopisi moleküler titreşim ile radyasyon etkileşiminin çalışmasını gerçekleştirirler, ancak foton enerji transferleri farklıdır. IR, ışık ve madde etkileşimindeki moleküler titreşim enerji seviyesini ölçerken, Raman iki fotonun inelastik saçılımını ölçmektedir. Gelen foton titreşim kuantum enerjisine göre daha fazla enerjilidir. IR ve Raman moleküle özgü “parmakizi” sağlamaktadır (Larkin, 2011).

Raman saçılımı, atomların titreşimleri ile ilişkili olarak fonksiyonel grupların polarizasyonundaki değişikliklerine bağlıdır. Bir Raman spektrumu, Raman kaymasının bir fonksiyonu olarak saçılan ışığın yoğunluğu grafik haline getirilerek elde edilmektedir (Li-Chan, 1996).

Raman Spektroskopisinde ışık veya foton ile molekül arasındaki etkileşimden dolayı farklı optik işlem mekanizmaları vardır. İlk durumda, foton molekül tarafından tamamen emilir ve dağıtılır. Monokromatik ışığın enerjisi ve saçılan foton enerjisi aynı frekansta olduğunda, Rayleigh bandı veya elastik saçılma olarak adlandırılır. Jablonski diyagramlarında Rayleigh bandı 0 cm^{-1} 'dedir. Yayılan foton ile saçılan foton arasında enerji değişikliği yoktur, saçılan ışıkta herhangi bir frekans değişimi bulunmamaktadır. Elastik olmayan saçılma görüldüğünde ise, yayılan foton ve saçılan foton arasında enerji seviyesi değişir. Bu durum Raman saçılması olarak adlandırılır ve iki olasılık vardır: Stokes saçılması ve anti-Stokes saçılması. Raman Stokes saçılmasında, fotonun başlangıç enerjisinin moleküle aktarılması olayıdır; saçılan fotonun enerjisi ve frekansı ilk radyasyona göre daha düşüktür. Anti-Stokes saçılmasında ise saçılan fotonun frekansı ve enerjisi başlangıca göre daha yüksektir. Molekülün enerjisi saçılan fotona aktarılmaktadır. Raman spektrumu olarak kaydedilen Stokes saçılımının yoğunluğu, anti-Stokes saçılımının yoğunluğundan daha yüksektir (Schrader, 1995; Ru ve Etchegoin, 2009; Temiz, 2019). Şekil 2.6'da spektroskopik geçişler gösterilmektedir (McCreery, 2001). Raman spektroskopisinin en önemli avantajı, su ve alkol için zayıf

bir Raman saçılımına sahip olmasıdır. Bu nedenle, yüksek su içeriğine sahip numuneler için özel bir numune hazırlama ya da uygulamaya ihtiyaç bulunmamaktadır (Rodriguez-Saona, Ayvaz ve Wehling, 2017).



Şekil 2.6. Çeşitli titreşim spektroskopilerindeki spektroskopik geçişler

Raman spektroskopisinin avantajlarına bakıldığında Raman spektroskopisi, IR spektroskopisinden farklı olarak simetrik $-S-S-$, $-C=C-$ gibi moleküler yapıları ölçebilmektedir. Raman spektrumları IR spektrumlarından daha nettir (Anonim, 2019f). Ancak Raman spektroskopisi diğer spektroskopik araçlara kıyasla zayıf sinyal yoğunluğuna sahiptir. Bu Raman spektroskopisinin kullanımının sınırlanmasına neden olur. Ayrıca RS, numunenin floresans özelliğini etkileyebilir. Floresans, sinyal yoğunluğuna neden olabilir. RS diğer spektroskopik tekniklere göre düşük hassasiyete sahiptir (Marquardt ve Wold, 2004; Lohumi ve ark., 2015).

Raman spektroskopisinin dispersiyon (dağıtıcı) ve Fourier dönüşümü gibi farklı teknolojileri vardır. FT-Raman spektrometresinin temel bileşenleri lazer, objektif lens, Michelson interferometre ve dedektördür. FT-Raman'ın dalga boyu, Neodimyum katkılı itriyum alüminyum garnet lazerlerinden 1064 nm uyarım özelliğine sahiptir. Bu sayede, floresans ile ilgili Raman spektroskopisinin kısıtlamalarının üstesinden gelinmektedir. Ayrıca, uygun dalga boyu doğruluğu ve mükemmel çözünürlüğü vardır. Raman

Spektroskopisinin diğerk teknolojisi dispersiyondur. Raman dispersiyon sistemi bir monokromatörük ışık kaynağına (lazer), objektif merceğıe, kırınım ağına, dedektöre ve bilgisayara sahiptir. Argon iyon lazerinden bir elde edilen tipik dalga boyları 457 nm, 488 nm ve 514 nm'dir. Ek olarak RS, Helyum-Neon lazerden elde edilen 633 nm ve diyot lazerlerden elde edilen 785 nm ve 830 nm dalga boylarına sahiptir (Li ve Church, 2014).

Raman spektroskopisi kalitatif ve kantitatif uygulamalar için kullanılabilir. Raman Spektroskopisi çok çeşitli gıda ürünlerinin kimyasal, fiziksel, mikrobiyal ve toksik özelliklerini analiz etmenin yanı sıra gıda örneklerin ayırımında ya da sınıflandırılmasında etkili bir yaklaşımdır (Boyacı ve ark., 2015). Soya, ayçiçeğı, kolza ve mısır yağı gibi bitkisel yemeklik yağlar ile zeytinyağının sınıflandırılması, zeytinyağı ile zeytinyağı dışındaki yağların ayrılması, tağışışın tespiti ve tağışışın miktarının belirlenmesi için farklı kemometrik yöntemlerle kombine edilmiş Raman ve FTIR spektroskopisi kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. FTIR spektroskopisi Raman spektroskopisine göre sınıflandırma durumlarında daha hassas sonuçlar verdiği görülmüştür (Jiménez-Carvelo ve ark., 2017). Taze Hindistan cevizi suyunun su ve yüksek fruktozlu mısır şurubu ile tağışışında Raman spektroskopisinin hızlı, doğru ve önemli bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Richardson ve ark., 2019). Protein takviyesi olarak kullanılan peynir altı suyu proteini ucuz kimyasal maddelerle tağışış edilmeye başlanılmıştır. PLS-DA ve yumuşak bağımsız modelleme sınıfı benzetmesi (soft independent modelling by class analogy, SIMCA) ile kombine edilmiş Raman spektroskopisinin peynir altı suyu proteininin tağışışını tespit etmede güçlü bir metot olduğu kanıtlanmıştır (Jiao ve ark., 2019).

Farklı kemometrik yöntemlerle margarin ile karıştırılmış tereyağının tağışış analizinde Raman spektroskopisinin hızlı tespiti olarak sağladığı bulunmuştur (Uysal ve ark., 2013). Başka bir çalışmada PLSR ile kombine edilmiş Raman spektroskopisi kullanılarak margarin ile tereyağı tağışışının tespiti için çalışılmıştır ve kullanım potansiyeli olduğu anlaşılmıştır. Tereyağı ve margarinin Raman spektrumları arasındaki temel fark, C = C çift bağı (1656 ve 1268 cm^{-1}) ve fosfolipitlerin kolin grubuyla ilişkili banttan (973 cm^{-1}) gelmektedir. Ayrıca piklerin yoğunluğu karşılaştırıldığında,

margarin içeriği azaldıkça pik yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir (Nedeljković ve ark., 2016).

PCA ile kombine edilmiş Raman verileri ile orijinlerine göre at ve sığır etinin sınıflandırılması gerçekleştirilmiş ve sığır etine eklenen at eti oranı tespit edilmiştir (Boyacı ve ark., 2014). 6 farklı balık türünden 64 balık örneğinde tazeliğinin tespit edilmesi amacıyla üç farklı deney düzeneği oluşturulmuş ve taze, dondurulmuş-çözündürülmüş, iki kez dondurulmuş-çözündürülmüş örneklerin PCA ile kombine edilmiş Raman verilerinin yüksek kümülatif varyansa sahip olduğu ve verilerin net bir şekilde ayrıldığı görülmüştür. Bu sınıflandırılmanın balık türlerindeki yağ asitleri farklılığına dayandığı tespit edilmiştir (Velioğlu, Temiz ve Boyacı, 2015). Balık kasında karotenoid, kolajen ve lipit içeriğinin ölçümleri için PCA ile kombine edilmiş Raman spektroskopisini (785 nm) kullanıma potansiyeli araştırılmıştır. Kas dokularında Raman saçılımına katkıda bulunan kolajen, elastin, karotenoidler, yağ asitleri, kolesteroler gibi bileşenler gıda kalitesini tanımlamak için yararlı olabilecek bileşenlerdir. Bu bağlamda balık kalitesinin hızlı tespiti için Raman spektroskopisinin faydalı bir cihaz olduğu tespit edilmiştir (Marquardt ve Wold, 2004).

Gazlı içeceklerdeki glikoz, früktoz ve sakarozun kantitatif analizi (İlaslan, Boyacı ve Topcu, 2015), damıtılmış alkollü içeceklerde etanol ve metanol miktarının belirlenmesi (Boyacı ve ark., 2012), unlu mamullerde yağ karışımının tespiti (Ucuncuoğlu ve ark., 2013), süt tozundaki melamin taşımasının belirlenmesi (Cheng ve ark., 2010), zeytinyağındaki prina yağı karışımının tespiti (Yang ve Irudayaraj, 2001) için Raman Spektroskopisi kullanılmıştır. Ayrıca Raman Spektroskopisi yumuşak ve sert ekmeklik buğday tanelerinin ve unlarının karakterizasyonunda kullanılmıştır. Her iki un ve buğday örnekleri için de Raman spektrumlarında benzer bantlar gözlenmiştir. Bununla birlikte, sert buğday unu ile yumuşak buğday ununun bant yoğunlukları ve nispi bant yoğunluk oranlarında farklılık görülmüştür. İki tip undaki arabinoksilan ve fenolik asit içeriği hakkında bilgi edinmek için RS kullanılabileceği ifade edilmiştir (Scudiero ve Morris, 2010). Son yıllarda yapılan birçok araştırmada kemometrik yöntemlerle kombine edilen Raman Spektroskopisinin, farklı türdeki gıda matrislerinde taşıması tespit etmek için kullanıldığı görülmüştür.

2.2.5. Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

NIR, FTIR, Raman Spektroskopisi gıda bileşiminin analizlerinde sıklıkla kullanılmasına rağmen düşük konsantrasyonundaki mineral içeriğinin tespitinde yeterince hassas olmayabilirler (Markiewicz-Keszycka ve ark., 2017). Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi (LIBS) numunenin bileşiminin tespiti ve karakterizasyonu için kullanılan atomik emisyon spektroskopi yöntemidir. LIBS lazer ışını ile katı ve sıvı örneklerin yüzeylerinde ve gaz, sıvı ve aerosol örneklerinin içinde plazma oluşturmaktadır. LIBS plazması, tek bir lazer darbesi veya tekrarlayan lazer darbeleri kullanılarak oluşturulmaktadır. LIBS analizleri genellikle çok az ya da hiçbir ön işlem gerektirmeden gerçekleştirilmektedir. Plazmadaki her bir uyarılmış atom benzersiz bir spektral çizgi kümesi yaymaktadır. LIBS'te yüksek güçlü lazer ışığı bir lens aracılığıyla numuneye odaklanarak plazma üretilmesi sağlanmaktadır. Kantitatif analizler tek elementli veya çok değişkenli kalibrasyon kullanılarak elde edilmektedir (Wong, Bol'shakov ve Russo, 2010). LIBS, son otuz yılda hızla gelişen analitik bir metottur (Cremers ve Radziemski, 2013). Ancak LIBS kullanımının sınırlandığı durumlar söz konusudur. LIBS sadece küçük bir alanda geri dönüşsüz olarak analiz gerçekleştirilmektedir, homojen olmayan bir örnekte numunenin geneli hakkında bilgi sağlayamayabilir (McClelland ve Mankin, 2018).

LIBS, lazer ışını ile numuneden elde edilen plazmanın analizidir. Radyasyon enerjisi ile numunenin yüzeyinde buharlaşma ile plazma oluşmaktadır. Plazma; atom, iyon ve serbest elektron içermektedir. Oluşan plazma da soğudukça enerji kaybı görülmekte ve element spesifik emisyon oluşmaktadır. Her bir element benzersiz elektron enerji seviyeleri olduğu için örnekteki atomik kompozisyon yayılan ışığın enerjisinden tanımlanmaktadır. Yayılan ışın spektrometre ile spekturuma dönüştürülmektedir. Numune hazırlama basamağının çok az olması, işletme maliyetinin düşük olması, çok elementi aynı anda hızlı test etmesi gibi birçok özelliğe ve avantaja sahip olması sayesinde LIBS son yıllarda zaman alıcı klasik metotlara alternatif oluşturmakta ve sıklıkla tercih edilmektedir (Noll, 2012; Markiewicz-Keszycka ve ark., 2017; McClelland ve Mankin, 2018). Karakteristik emisyon bantları UV, görünür bölge ve yakın IR de üretilmektedir.

Tipik bir LIBS sisteminde; darbeli lazer, lazer odaklama lensi, plazma ışığı toplama optik sistemi, spektrometre ve numune bölmesi bulunmaktadır. Gıda analizlerinin çoğunluğunda yüksek güçlü Q anahtarlı (darbe modu) neodimyum katkılı itriyum alüminyum garnet (Nd: YAG) lazeri kullanılmaktadır. Bu lazer 5 -1000 ns lazer atımları sağlamaktadır (Markiewicz-Keszycka ve ark., 2017). Odaklanma merceği, lazerin örnek yüzeyinde toplanmasını sağlamaktadır. Böylece örnek yüzeyinde buharlaşma ile plazma ortaya çıkmaktadır. Plazmadaki uyarılmış atomlar, iyonlar ve basit moleküller tarafından yayılan ışık, spektrometre ile dedektöre iletilir ve dedektör tarafından emisyon sinyalleri kaydedilir (Cremers ve Radziemski, 2013). LIBS'in performansını belirleyen iki önemli unsur bulunmaktadır: lazer ve spektrometre. Lazerin atımı ile örnek ısınarak plazma oluşmaktadır. Spektrometrenin rolü yayılan ışığın yoğunluğunu, frekansın fonksiyonu olarak kaydetmesidir. Spektrometre, spektrograf ve dedektörden oluşmaktadır. Spektrograf; plazmadan gelen ışığı frekans spektrumuna ayırırken, dedektör elektromanyetik radyasyonun farklı frekanslarının yoğunluğunu ölçmektedir. Spektrometrenin performansını belirleyen üç ana parametre vardır: spektral aralık, çözünürlük ve rezolüsyon süresidir (Rakovský ve ark., 2014). LIBS sisteminin ölçüm kapasitesi spektral aralık ile tanımlanmaktadır. Farklı spektral aralıklarına sahip LIBS cihazları mevcuttur. Önemli elementlerle ilgili atomik emisyon bantları LIBS'te 190-850 nm dalga boyu arasında ortaya çıkmaktadır. Geniş dalga boyu, birkaç ögenin aynı anda kaydedilmesine olanak sağlamaktadır. Spektral çözünürlük ise, spektrografın elektromanyetik spektrumundaki özellikleri çözme yeteneğini belirler. LIBS'de genellikle Yük Eşleşmiş Cihaz dedektörü kullanılmaktadır. Yük Eşleşmiş Cihaz dedektörü, dijital görüntüleme için kullanılan oldukça hassas fotoelektron dedektörleri olan mikro-elektronik bir cihazdır (Markiewicz-Keszycka ve ark., 2017). LIBS emisyon bantlarının yoğunluğu element konsantrasyonu, plazma ve atmosferik havanın etkileşimi ile ilişkilidir (Martelli ve ark., 2010).

Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi gıda ve kimyasal analiz alanında son dönemlerde popüler hale gelen bir optik emisyon tekniğidir (Markiewicz-Keszycka ve ark., 2017). Çiğ (kavrulmamış) ve öğütülmüş kahvenin kalitesini analiz etmek için LIBS'in potansiyeli araştırılmıştır. PCA analizi ile kombine edilmiş LIBS'in, elementel ve moleküler kompozisyon farklılıklarından faydalanılarak iyi tanelerin kahve kalitesini

kötü etkileyen yeşil, ekşi ve siyah tanelerden net bir şekilde ayırdığı tespit edilmiştir (Silva ve ark., 2017).

Farklı inek, keçi ve koyun sütleri ve süt karışımlarının sınıflandırılmasında LIBS kullanılmıştır. Örnekler süt tozu şeklinde hazırlanmıştır. Saf sütlerin sınıflandırılmasında PCA ve yapay sinir ağı metotları kullanılmıştır. Kullanılan modellerin sağlamlık parametreleri %98 ve %100 şeklindedir. İlâveten ikili ve üçlü kombinasyon olacak şekilde on iki süt karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımlarda yapay sinir ağı ile örnekler genel olarak doğru bir şekilde sınıflandırılmıştır. Ayrıca aynı çalışmada farklı konsantrasyonda melamin eklenmesi ile sütte melamin tağşişi araştırılmıştır. Melamin miktarının belirlenmesi için farklı modellerde yüksek korelasyon katsayısı (0.982 ve 0.999) elde edilmiştir. Sütün kalitatif ve kantitatif analizi için LIBS'in yüksek potansiyeli olduğu tespit edilmiştir (Moncayo ve ark., 2017). Süt tozu, asidik ve tatlı peynir altı suyu tozu kullanılarak LIBS de bir çalışma gerçekleştirilmiştir. PCA analizi ile süt tozunun, asidik ve tatlı peynir altı suyu tozunun net bir şekilde ayrıldığı ve ayrılma oranının % 80,5 olduğu bulunmuştur. Ayrımın temel sebebinin süt ve peynir altı suyu ürünleri arasındaki temel kompozisyon farklılıklarına dayandığı ifade edilmiştir. Ayrıca süt tozunun, asidik ve tatlı peynir altı suyu tozu ile tağşişinin tespiti için PLS modeli oluşturulmuştur. Sütteki tatlı peynir altı suyu tozu tağşişi tespit seviyesi %1.55 iken sütteki asidik peynir altı suyu tozu tağşişi tespit seviyesi %0.55 olarak belirlenmiştir. Güvenilir, hassas ve kısa analiz süresi gibi özellikleri olan LIBS'in, peynir altı suyu tozu ile karıştırılmış süt tozunun belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Bilge ve ark., 2016b). Tereyağı ile margarin karışımının belirlenmesi amacıyla PCA ile PLSR analizleri ile kombine edilmiş LIBS'den elde edilen veriler incelendiğinde saf margarin, saf tereyağı ve %50 tağşiş edilmiş örnekler net bir şekilde kümeleşmiştir. PLS kalibrasyon ve validasyon grafiklerinde ise yüksek R^2 (0.999 ve 0.984) bulunmuştur (Temiz ve ark., 2018).

Unların mineral içeriğinin tespiti için uzun süreli klasik analizler kullanılmaktadır. Zaman alıcı klasik yöntemlere alternatif oluşturmak için bir çalışmada LIBS kullanılmıştır. Farklı kül içeriğine sahip buğday unlarının verileri PLS ile kombine edilmiştir. Külün tespit limitinin 0.026 olduğu bulunmuştur (Bilge ve ark., 2016a).

Başka bir çalışmada manyok unu örneklerinde Ca, K ve Mg miktarının tespiti amacıyla LIBS ve indüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP OES) kullanılmış, LIBS verileri ile ICP'den elde edilen referans değerleri arasında iyi bir korelasyon olduğu görülmüştür (Costa ve ark., 2017). Glutensiz ürünlerle beslenen insanların uzun vadede mineral eksikliğinin görülme olasılığı yüksektir. Bu nedenle başka bir çalışmada glutensiz unların mineral bileşiminin hızlı tespiti amacıyla LIBS kullanılmıştır. Tapyoka, patates, mısır, karabuğday, kahverengi pirinç ve glutensiz un karışımı toplam 6 farklı glutensiz unun kül, potasyum ve magnezyum içeriği belirlenmiştir. PCA analiziyle unların net bir şekilde ayrılıp kümeleştiği görülmüştür. PLSR veri analizi incelendiğinde ise tespit limiti kül için %0.37 iken potasyum ve magnezyum için 0.85 mg/g ve 0.29 mg/g olduğu bulunmuştur. LIBS'in gıda ürünlerindeki kalite parametrelerinin tespitinde iyi bir analiz metodu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Markiewicz-Keszycka ve ark., 2018). Buğday unu inorganik bileşenlerinin (P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn ve Zn) tespiti için LIBS ve enerji dağıtıcı X-ışını floresans spektrometresi kullanılmıştır. LIBS kullanılarak Zn için 0.9705 ve Mg için 0.9990 korelasyon katsayıları elde edilmiştir. RMSEP değerlerine dayalı tahmin kapasitesi verilerine göre LIBS'in kullanılmasının P, Ca, Mg, Fe, Mn ve Zn tayini için uygun olduğu görülmüştür (Peruchi ve ark., 2014).

Gıdaların fizikokimyasal bileşimi ile biyoaktif bileşenlerinin, makro ve mikro besin değerlerinin (karbonhidratlar, proteinler, lipitler, lif, kül, mineraller, vitaminler vb.) hesaplanması, menşenin belirlenmesi veya taşımasının saptanması gibi birçok kalitatif ve kantitatif analizlerin gerçekleştirilmesinde spektroskopik analizlerin başarılı olduğu görülmektedir. Zaman alıcı, zahmetli numune hazırlama işlemi gerektiren ve genellikle çevresel kirliliğe yol açıcı toksik atık oluşturan klasik analitik yöntemlerin aksine hızlı, numune hazırlama basamağı çok az veya genellikle hiç olmayan, operatörler için risk oluşturmayan veya toksik atık üretmeyen yeşil teknolojilerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Pallone, Dos Santos Caramês and Alamar, 2018).

2.3. Kromatografik Analiz

Gıda piyasasında karşılaşılan en yaygın gıda taşışileri; gerçek hammadde yerine daha ucuz ya da kolay ulaşılan maddelerle ikamesinin yapılması, yasal olmayan maddelerin

ilave edilmesi, tadını-rengini-aromasını geliştirmek ya da maskelemek için farklı maddelerin ilave edilmesi şeklindeyir. Gıda tağşışlerinin tanımlanmasında kullanılan teknikleri içeren yayınlara bakıldığında en çok kullanılan yöntemin IR olduğu görülmüştür. IR spektroskopisini takiben gıda tağşışinin tespitinde kütle spektroskopisi, sıvı ve gaz kromatografileri, PCR yöntemleri ile çalışıldığı görülmüştür. En az kullanılan yöntemlerin ise elektronik burun ve termal kalorimetre metotları olduğu görülmüştür. Kullanılacak test yönteminin seçimi; test edilecek maddenin kimyasal bileşimi veya fiziksel özellikleri ile analiz edilecek moleküllerin doğasına bağlıdır (Aristoy ve Toldr, 2015). Tüm spektroskopik metotlar örneğin sadece küçük bir kısımda ölçüm yapmakta, özellikle homojen olmayan numunelerde kapsamlı karakterizasyonun gerçekleştirilmesini sınırlamaktadır (Sikorska, Khmelinskii ve Sikorski, 2019). Bu bağlamda tağşışin tespitinde en yaygın kullanılan ikinci metot olan kromatografik analizlerin potansiyeli tez kapsamında incelenmiştir.

Kromatografi genel prensip olarak bir numunenin (znen maddenin) sabit/hareketsiz bir faz ve hareketli/mobil faz arasındaki dağılımına dayanmaktadır. znen maddenin sabit fazdaki çözünen konsantrasyonunun mobil fazdaki çözünen konsantrasyonuna oranı, dağılım ya da partisyon katsayısı olarak tanımlanmaktadır. znen maddenin bileşenleri sabit fazda tutunarak farklı srelerde ayrılmaktadır. Mobil faz gaz, sıvı ya da süperkritik sıvı olurken sabit faz katı ya da sıvı olabilir. Mobil fazına göre isimlendirilen kromatografilerden sıvı kromatografisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisinde ise en yaygın olarak kullanılan cihaz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high-performance liquid chromatography, HPLC)'dir. Sıvı kromatografileri (liquid chromatography, LC), laboratuvarlarda en çok kullanılan ayırma tekniğidir. Gaz kromatografisinden farklı olarak herhangi bir numunenin buharlaştırılma aşaması bulunmamaktadır. nemli olan numunenin hareketli fazda çözünmesidir. Bu nedenle numune hazırlama basamaklarında santrifüj ve filtrasyon gibi ön hazırlık aşamaları bulunmaktadır (Nielsen ve Talcott, 2017). HPLC, organik asit, amino asitler, vitaminler, pestisitler, metabolitler, gıda katkıları, mikotoksin gibi birçok gıda analizinde kullanılmaktadır. HPLC'nin mobil fazı sıvıdır. İtici gücü ise pompa tarafından sağlanan akıştır. Kromatografik analizlerin modları incelendiğinde normal, ters, hidrofobik interaksiyon, katyon-anyon değişimi, afinite, boyut dışlama gibi modları bulunmaktadır (Ismail, 2017). Ters faz, iyon değişimi ve hidrofilik etkileşim

kromatografisi, gıdanın saptanması için tercih edilen ayırma modlarıdır. Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi, polar sabit fazlar kullanılarak hidrofilik bileşiklerin ayrılması temeline dayanmaktadır. Normal faz kromatografisinin aksine, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisinde kullanılan hareketli fazlar, suludur ve ayırma işlemi partiyon ve polar/iyonik bir mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. LC'nin avantajları iyi bir seçicilik ve hassasiyete sahip olmasıdır. Ayrıca LC farklı tipteki birçok gıda maddesi için uygulanabilir. Literatürde zeytinyağı, süt, et, bal vb. gıda maddelerinin taşıdığı LC kullanılması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. En önemli dezavantajları ise örnek hazırlama gerekliliği ve uzun süren analiz süresidir (Vasquez-Villanueva ve ark., 2015).

HPLC'nin avantajları incelendiğinde çok çeşitli sabit faz seçeneği, yüksek hassasiyet ve gelişmiş çözünürlük gibi özellikler görülmektedir. HPLC sisteminin temel bileşenleri pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgi işleme sistemleridir. HPLC pompası, genellikle 0.4–1.0 mL/dakika akış hızında hareketli fazın kontrollü bir şekilde akışını sağlamaktadır. Genellikle HPLC sisteminde piston tipi pompalar kullanılmaktadır. Otomatik ya da manuel olabilen enjektör, numunenin hareketli faza aktarılmasını sağlamaktadır. Enjektör hacmi 10-100 µL arasındadır. Kolon materyali incelendiğinde ise silika bazlı ya da sentetik organik reçineler bazlı kolon materyalleri mevcuttur. HPLC'de normal ve ters faz ayırma modlarının uygulamaları bulunmaktadır. HPLC uygulamalarının %70'den fazlası ters faz modunda gerçekleştirilmektedir. Polar mobil faz ve polar olmayan ayırma prensibine dayanan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC) oktadesil (C18) zinciri [- (CH₂)₁₇CH₃] ile bağlı oktadesilsilil en popüler ters faz malzemesidir. Silika jel temelli ters faz kolonları ticari olarak piyasada bulunmaktadır. Polar mobil faz olarak; metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran ile karıştırılmış su kullanılmaktadır. Çözünen maddeler, polar olmayan sabit faz ile hidrofobik etkileşime girmektedir ve polaritesine göre alıkonma süresi değişmektedir. Düşük polarite, başka bir deyişle yüksek hidrofobiklik düzeyine göre ayrışmaktadır. Numunenin bileşenleri kolon boyunca ilerledikçe, hidrokarbon sabit fazı ve mobil faz arasında ayrışmaktadır. Ayrışma, alıkonma süresi ile ilişkilidir. Polar olmayan moleküller polar moleküllere göre polar olmayan durgun fazda daha fazla alıkonmaktadır. RP-HPLC; su ve yağda çözünen vitaminler, fenolik maddeler,

antioksidanlar, lipit ve bitkisel proteinlerin analizlerinde kullanılmaktadır. Bitkisel proteinler içinde en zor izole ve karakterize edilen hububat proteinlerinin rutin analizinde de RP-HPLC kullanılmaktadır (Ismail, 2017; Lundanes, Reubsaet ve Greibrokk, 2013; Nielsen ve Talcott, 2017; Reuhs, 2017).

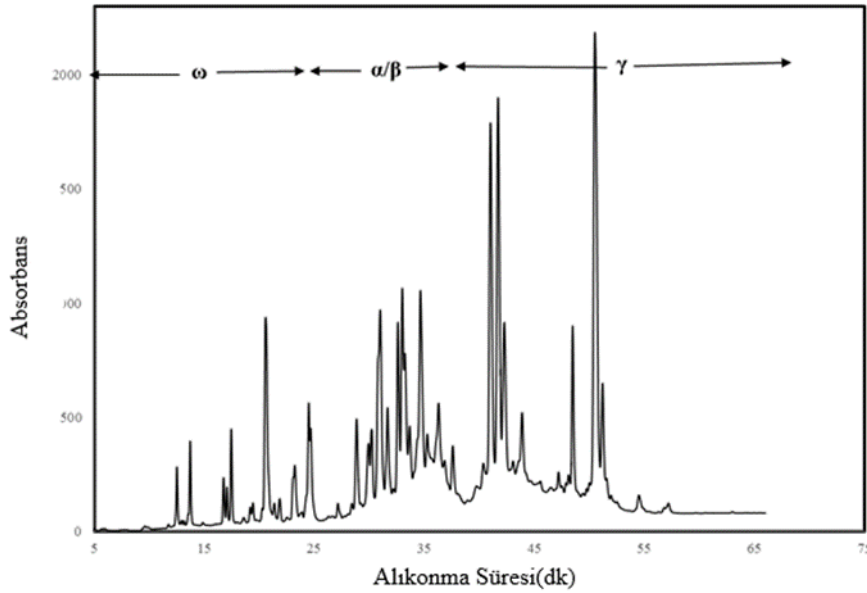
RP-HPLC, protein ve peptitlerin ayrıştırılmasında yüksek geri kazanım, tekrarlanabilirliğe ve tekrarüretibilirliğe sahip olması nedeniyle etkili bir yöntemdir. Peptitler ve proteinler kromatografik yüzey ile etkileşime girmektedir. Moleküller, molekül boyutu ve polaritesi ile ilgili olarak yüzey hidrofobikliği veya yükündeki farklılıklara göre ayrılmaktadırlar. Bu nedenle RP-HPLC’de kompleks moleküllerin ayrımı hidrofobik özelliklerine göre gerçekleştirilmektedir. Peptitlerin ve proteinlerin analizi için RP-HPLC deney sistemi genellikle n-alkilsilika bazlı bir sorbentte çözünen maddelerin, organik çözücüde elüsyon edilmesi ile oluşmaktadır. Ters fazda genellikle suyal karışabilen organik çözücü içeren mobil fazlar kullanılmaktadır. Bu çözeltiler suasetonitril ya da metanol-su karışımlarıdır. Organik çözücü olarak ise trifluoroasetik asit (TFA) gibi bir iyonik değiştirici içeren asetonitril örnek olarak verilebilir. Çözücü gradyanları tipik olarak %5 asetonitril veya metanol ile başlamaktadır. Organik çözücü miktarı kademeli olarak artmaktadır. C18 kolon materyali kullanılması durumunda ise %0 organik çözücü ile başlanılmaktadır. Bunun sebebi yüzeyde düzleşme riski nedeniyle, yükleme kapasitesinin ve alıkonmasının düşük olması ile sonuçlanmasıdır. (Aguilar, 2004; Lundanes, Reubsaet ve Greibrokk, 2013).

Kromatogramın x eksenini, alıkonma süresi olarak bilinen ve dakika ile ifade edilen zaman birimi, y eksenini ise dedektör sinyal boyutudur ve absorbans yoğunluğunun ölçümü ile ilgilidir, birimi mili-Absorbans Birimi (mAU) şeklinde ifade edilmektedir. Kromatografi, pik yüksekliği ve alıkonma süresi hakkında bilgi vermektedir (Scanlon ve ark., 1989).

Buğday proteini olarak bilinen gluten, çözünürlüklerine göre iki ana gruptan oluşmaktadır: alkolde çözünen gliadinler ve asitte çözünen gluteninler. Gliadinler 28,000-55,000 moleküler ağırlığa sahip depo proteindir. Gliadinler pH jel elektroforezindeki mobilitelerine göre 4 alt fraksiyona ayrılır: ω -gliadinler, β -gliadinler,

α -gliadinler ve γ -gliadinler. α -gliadinler ve β -gliadinler çok benzer amino asit dizilimine sahiptir, bu nedenle birlikte α/β -gliadinler olarak anılırlar. ω -gliadinler 44,000-55,000 molekül ağırlığına sahipken α/β - ile γ - gliadinin kütlesi 28,000-50,000'dir. Gliadinlerin amino asit kompozisyonuna ve molekül ağırlığı göre omega5-, omega1,2-, alfa /beta- ve gama-olarak ayrılması için iki boyutlu elektroforez veya ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılmaktadır.

Gliadinlerin RP-HPLC'deki elüsyon profili, hidrofobik özellikleri nedeniyle sırasıyla ω -gliadinler (5-25 dakika), α/β -gliadinler (25-40 dakika) ve γ -gliadinlerdir (40-55 dakika). Gliadinlerin RP-HPLC profili Şekil 2.7'de gösterilmektedir (Malalgoda, 2016).



Şekil 2.7. Gliadinlerin RP-HPLC profili

ω -gliadinlerde; glutamin, prolin ve fenilalaninlerin içeriği yüksektir. α/β -gliadinleri daha düşük prolin ve fenilalanin içeriğine sahiptir. γ -gliadinlerde, prolin, metionin, fenilalanin ve lizin içeriği daha yüksekken glutamin, tirozin ve histinid içeriği daha düşüktür. ω 5-gliadinlerin amino asit bileşimi %55-56 glutamin, %19-20 prolin ve %9-10 fenilalanin şeklindedir. α -gliadinlerin amino asit profili; %36-41 glutamin, %15-19 prolin ve %3-4 fenilalanin, %3-4 tirozin ve %1-2 sistein şeklindedir. Farklı buğday çeşitlerinde bile karakteristik pikleri neredeyse aynı amino asit profiline sahiptir. Tüm ekmeklik buğdayların kromatogramlarında bazı ortak pikler mevcuttur: 27. dakikadaki

pik, 43 ve 44. dakikadaki çift veya üçlü pikler, 55 ve 57. dakikadaki çift piktir. Buğday örneklerinin çeşidine göre bazı noktalarda küçük nicel ve nitel farklılıklar vardır. Clement'in çeşidi için 22, 24 ve 25 dakika da pikler görülürken, Rekor çeşidi için 71 ve 73. dakikalardaki pikler saptanmıştır. CWRS sınıfındaki çeşitler için ise 23 ve 69. dakikada pikler mevcuttur. Durum buğdayı incelendiğinde ise, ekmeçlik buğdayda görülen 27, 55 ve 57. dakikalardaki piklerin artık gözlenmediği tespit edilmiştir. Makarnalık buğday için dominat pikleri 47, 65, 68 ve 69. dakikalarda görülmüştür (Wieser ve ark., 1983; Wieser, 1996; Wieser, 2007).

RP-HPLC kullanılan başka bir çalışmada, ekmeçlik buğday örnekleri analiz edildiğinde durum buğdayından farklı olarak 47.20 ve 47.94. dakikada iki ana ve karakteristik pik olduğu tespit edilmiştir. Bu pikler D-genomu tarafından kodlanan proteinlerle ilişkilidir. Bazı çeşitlerde 50.30 ve 52.46. dakikada iki ayrı pik olduğu görülmüştür. Durum buğday numuneleri RP-HPLC'de analiz edildiğinde ise, 48.73, 50.47, 51.37 ve 52.80 dakikalarda pikler tespit edilmiştir. Durum buğdayına ekmeçlik buğdayı eklendiğinde ise 50.30 ve 52.46. dakikadaki piklerin azaldığı saptanmıştır (McCarthy ve ark., 1990).

2.4. Kemometrik Analiz Yöntemleri

Spektrumlardaki gibi büyük veri gruplarının yorumlanması için piklerin konumunu, şiddetini ve piklerin birbirine göre bağıl şiddetini dikkate alan istatistik modellere ihtiyaç bulunmaktadır (Taş, 2008). Kemometrik optimizasyon teknikleri, optimum koşulların sağlanabilmesi amacıyla deneysel dizaynlar oluşturmaktadır (Brereton, 2007).

Kemometrik yöntemlerden biri olan Temel Bileşen Analizi (Principal component analysis, PCA) yöntemi; çok bileşenli veriler arasında korelasyonun olmadığı durumlarda verilerin tamamında desen ve ilişkiyi görmek amacıyla kullanılan bir tekniktir (Ertokuş, 2011). Veri analizi için bilinen bir araç olan PCA, verilerin temel eğilimlerini açıklamaktadır. PCA da kullanılan veriler çok değişkenlidir. Birçok dalga sayısı içeren spektroskopik veriler çok değişkenli olarak ifade edilmekte, böylelikle PCA için uygun bir veri seti sağlamaktadır. PCA yönteminde veri setleri; benzer birimlere çevrilmeleri veya ortalama değer etrafında toplanmaları amacıyla çeşitli ön

işlemlere tabi tutulmaktadır. Ön işlemler, verileri analiz etmeden ya da model oluşturmadan önce yapılan veri modifikasyonudur. Ön işlemin amacı, değişkenlerin yanıtını linearize etmek ve sapan değerleri ortadan kaldırmaktır. Verilere; merkezleştirme, standardizasyon, normalizasyon, türevleme gibi ön işlemler uygulanmaktadır (Wise ve ark., 2006; Brereton, 2007; Parlatan, 2010; Sultanoğlu, 2011).

Her bileşen için hem X hem de Y matrisini ilişkilendirmeyi öngörmek amacıyla Kısmi En Küçük Kareler (PLS) modeli kullanılabilir. Diskriminant analizi (DA) ise farklı sınıfları ayırmak için kullanılmaktadır. Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi (Partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), önceden tanımlanmış gruplara göre bilinmeyen örneklerin sınıflandırılması için kullanılmaktadır. Bu istatistiksel modelin temel amacı, spektrum veya kromatogram verileri kullanılarak numunelerin sınıflandırılmasını sağlamaktır. Kısmi En Küçük Kareler Regresyon (Partial least squares regression, PLSR) Analizi ise (çok) büyük bağımsız değişken kümesinden bağımlı değişkenler kümesini tahmin etmek için kullanılmaktadır. PLS regresyonunun amacı ortak yapıları tanımlayarak X'ten Y'ye modelleme ile ulaşmaktır (Abdi, 2010).

Verilerin araştırılması için iki önemli basamak veri grubu bulunmaktadır: kalibrasyon ve tahmin (prediction) grubu. Ayrıca modelin sağlamlığını kontrol etmek için kalibrasyon setindeki verilerin kullanılması ile çapraz validasyon test edilmektedir. Tahmin modeli ise kalibrasyon setinde bulunmayan değeri bilinmeyen örneğin değerini tahmin etme yeteneğininin değerlendirilmesidir (Romía ve Bernárdez, 2009). Kalibrasyon verileri, bağımlı (Y) ve bağımsız (X) gruplar arasındaki model davranışının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Tahmin verileri, bağımlı değişkenler için değerleri tahmin etmeye yardımcı olur. Model kurulmadan önce çeşitli ön işlemlerin kullanılması ise genel bir yaklaşımdır.

Ön işlem tekniklerine; boyutlandırma ve merkezlenme olarak kullanılan otomatik ölçeklendirme (autoscale, AS), ortalama merkez (mean center, MC), medyan merkez (median center, MNC) örnek olarak verilmektedir. Baseline düzeltmesi olarak bilinen teknikte ise taban çizgisi düzeltmesi (baseline correction-BLC), türevlendirme (derivative, DERIV), yönsemeyi giderme (detrend, DET), düzgünleştirme (smoothing,

SMO), genelleştirilmiş en küçük kareler ağırlığı (generalized least squares weighting, GLSW) teknikleri kullanılmaktadır. Düzleştirme olarak tanımlanan ön işlemler ise çarpımsal saçılma düzeltmesi (multiplicative scatter correction, MSC), normalleştirme (normalizing, NORM), standart normal değişken (standard normal variate, SNV)'dir.

Verilerin ön işlemleri, iyi ve sağlam tahmin modeli inşa etmek ve verileri sınıflandırmak için uygulanmaktadır. Moleküler etkileşim, interefanslar, kaymalar, kırılma indisleri gibi birçok kimyasal ve fiziksel olgular, ölçülen madde konsantrasyonu ile elde edilen absorbans arasındaki istenilen doğrulsallıkta sapmaya neden olabilir. Ön işlem teknikleri, bu sapmaları telafi etmek için tasarlanmıştır. Ön işlemin temel amacı çok değişkenli sinyal verilerini dönüştürerek absorbans ile konsantrasyon arasında doğrusal ilişkiyi sağlamaktır. NIR, IR spektroskopisi için en yaygın kullanılan ön işlem taban çizgisi düzeltmesi düzeltmesidir (Rinnan ve ark., 2009).

En yaygın ön işlemlerden bir diğeri olan ortalama merkez, her bir sütunun merkezi ortalamasını hesaplayarak her bir sütundan çıkartılması işlemidir. Ortalama merkezi yorumlamanın bir başka yolu ise orijinal veri matrisindeki ortalama örnekten farklı olanların sıralanmasıdır (Wise ve ark., 2006). Ortalama merkez işleminde, değişkenlerin merkezlenmesi sağlanırken autoscaling ön işleminde her bir yanıt ortalama yanıtın çıkarılarak elde edilen değerin standart sapma ile ortalanmış değere bölünmesi ile elde edilmektedir (Romía ve Bernàrdez, 2009). Verileri taban çizgisinden uzaklaştırmak amacıyla kullanılan diğeri bir ön işlem metodu ise taban çizgisi düzgünleştirme metodudur.

Türevlendirme, değişken sayısına ya da diğeri ilgili eksen ölçeği (dalga boyu, dalga sayısı vb.) açısından ölçülen cevapların türevlerini alarak örneklerdeki önemsiz temel sinyali kaldırmak için kullanılan yaygın bir metottur. Türevlendirme, yüksek geçişli filtrenin bir formudur. Yönsmeyi giderme (detrend); sabit, doğrusal veya eğimli durumlarını ortadan kaldırmak amacıyla kullanılmaktadır. Yönsmeyi giderme, tüm örneklerin belirli bir düzende polinoma uyarlanmasıdır. Yönsmeyi giderme; değişimleri ortadan kaldırma eğiliminde olup diğeri doğrusal olanlardan, doğrusal olmayan cevaplar oluşturabilmektedir. Düzgünleştirme (smoothing); örneklerdeki yüksek frekanslı gürültüyü uzaklaştırmak için kullanılan düşük geçişli filtreleme

işlemidir. Genellikle spektrumlarda kullanılan düzgünleştirme; veri matrisindeki her bir sıra için ayrı ayrı uygulanmaktadır (Wise et al., 2006).

Verilere ön işlem yapılmasının amacı, elde edilen sinyallerdeki aranan bilgilerle ilişkisi olmayan katkıları elimine etmek ve sonuçların doğruluğu ile kesinliğini arttırmaktır. Ön işlem seçimi yapılırken kabul edilebilir tahmin yeteneğine ve sağlamlığa sahip modeller seçilmelidir. En önemli dezavantaj ise en iyi istatistiksel sonuç elde edilen ön işlemin ampirik şekilde deneme yanılma ile seçilmesidir. Faktör sayısı yani gizli değişken (GD) sayısının seçimi modelin optimizasyonu için önemlidir. Optimal değerden daha küçük gizli değişken seçimi, modelin gereğinden az çalışmasına (underfitting) ve dolayısıyla büyük hataya yol açarken optimal değerden yüksek gizli değişken sayısı seçilmesi ise gürültüyü artırmakta (overfitting) ve benzer olarak büyük hatalara sebebiyet vermektedir. Optimum değişken sayısını bulmak için en temel yol; faktör sayısına karşı hata kareler ortalamasının karekökünü grafik haline getirerek eğride minimuma karşılık gelen gizli değişkeni seçmektir. Bu; minimum tahmin hatasının varlığı yani en iyi tahmin yeteneği durumudur (Romía ve Bernàrdez, 2009).

Kalitatif yöntemin performans parametreleri doğru pozitif-negatif, yanlış pozitif-negatif, seçicilik ve spesifiklik oranları, kalibrasyon modelinin hata kareler ortalamasının karekökü (root mean square error of calibration, RMSEC), çapraz validasyon modelinin hata kareler ortalamasının karekökü (root mean squared error of cross-validation, RMSECV) ve tahmin modelinin hata kareler ortalamasının karekökü (root mean square error of prediction, RMSEP) şeklindedir. Sınıflandırma yöntemi; bilinmeyen örneklerin tanımlanmış sınıflardan birine aitliğinin matematiksel olarak öngörülmesidir.

Yaygın sınıflandırma da kullanılan iki temel doğru ve yanlış sınıfı mevcuttur. Bu sınıfların dört tane çıktısı bulunmaktadır. Bunlar; yanlış pozitif (YP), yanlış negatif (YN), doğru pozitif (DP) ve doğru negatif (DN) tir (Ballabio ve Todeschini, 2009). Yanlış pozitif, negatif test numunesinin pozitif test numuneleri olarak sınıflandırılma durumunda yanlış sınıflandıran olarak tanımlanırken, yanlış negatif ise pozitif test örneğinin yanlışlıkla negatif test örneği olarak etiketlenmesidir. Doğru pozitif, pozitif örneğin gerçek pozitif olarak algılanmasıdır ve doğru pozitif orana duyarlılık da denir. Duyarlılık/hassasiyet (Sensitivity, Sen), pozitif bir testin pozitif örnek olarak doğru

olarak sınıflandırma yeteneğinin anlamıdır. Doğru negatif (TN), negatif numunelerin gerçekten negatif olarak algılanmasıdır. Gerçek negatif orana, özgüllük (Specificity, Spec) de denir. Özgüllük, gerçekten negatif örnekleri negatif örnek olarak tahmin etme yeteneğinin anlamıdır (Geladi ve Kowalski, 1986; Wold, Sjöström ve Eriksson, 2001; Trullols, Ruisanchez ve Rius., 2004; Parikh ve ark., 2008; Temiz, 2019). Doğru pozitif oranı (DPO) ve yanlış pozitif oranının (YPO) ifade edilmesiyle hassasiyet ve özgüllük değerleri elde edilmektedir. Gerçek pozitif belirli bir sınıfın doğru sınıflandırılması olarak tanımlanırken, gerçek negatif değeri ilgili sınıf modeli tarafından reddedilmesidir. Hassasiyet, tahmin setindeki örneklerin model sınıfı tarafından tanınma yüzdesidir. Özgüllük, model sınıfı tarafından doğru reddedilen diğer kategorilerdeki örneklerin yüzdesidir (Balan ve ark., 2020). Doğru pozitif oranı (DPO) ve yanlış pozitif oranı (YPO) Eşitlik 1 ve 2'deki formüllere göre hesaplanmaktadır.

$$DPO = \frac{DP}{(DP+YN)} \quad \text{Eş. 1}$$

$$YPO = \frac{YP}{(YP+YN)} \quad \text{Eş. 2}$$

Kalibrasyon ölçüm sonucu elde edilen verilerle değeri bilinen verilerin arasındaki matematiksel ilişki prosesidir. Birçok analitik teknik, ölçülen sinyal ile konsantrasyon arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermektedir. Analitik sinyal sadece modelin geliştirildiği spesifik analitin konsantrasyonuna bağlıysa doğrusal bir kalibrasyon modeli yalnızca nicel amaçlar için yararlı olabilir. Veri seti, hedef parametreler için yeterli bir tahmin yeteneğine sahip modellerin geliştirilmesine izin verecek kadar büyük olmalıdır.

Kalibrasyonun amacı özelliği bilinmeyen örneklerinin doğru bir şekilde gerçek değere en yakın şekilde belirlenmesini sağlayan bir denklemdeki parametreleri hesaplamaktır. Modelin kalitesi ise bazı istatistiksel parametrelerle ortaya konmaktadır. Kalibrasyon modelini değerlendirmek için genellikle kullanılan istatistikler, tahmin hatasının artık kareler toplamı olarak hesaplanmasıdır. Tahmin edilen artık hata toplamı kareleri, y bağımlı değişken değeri ile hesaplanır ve modelin uyumu hakkında bilgi vermektedir.

Tahmin edilen artık hata toplamı kareler değeri, numune (n) sayısına bölüldüğünde hata kareler ortalaması (mean square error, MSE) elde edilmektedir. MSE değerinin karekökü ise hata kareler ortalamasının karekökü (root mean square error, RMSE) olarak ifade edilmektedir (Romía ve Bernàrdez, 2009). MSE ve RMSE değerleri, Eşitlik 3 ve 4'deki formüllere göre hesaplanmaktadır.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n} \quad \text{Eş. 3}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad \text{Eş. 4}$$

Kalibrasyon modelinin hata kareler ortalamasının karekökü, verilerin modele uyumu hakkında bilgi verirken, çapraz validasyon modelinin hata kareler ortalamasının karekökü bilinmeyen örneklerin sınıfının bulunması sırasında çapraz validasyon ile hatanın hesaplanmasıdır. Çapraz validasyon modelini test edilmesi için yapay set oluşturulmaktadır. Tahmin modelinin hata kareler ortalamasının karekökü ise, gerçek ve tahmin verileri arasındaki farkı hesaplamak için kullanılan tahmin hatasıdır. Tüm hatalar model biası ile ilgilidir. Modeldeki hatanın önemsiz olması durumunda RMSEC ve RMSECV değerlerinin düşük olması beklenmektedir. Model hatası önemliyse, büyük sapma nedeniyle RMSEC ve RMSECV değerleri daha yüksek çıkar (Faber, Song ve Hopke, 2003; Bro, Rinnan ve Faber, 2005; Gowen ve ark., 2011; Temiz, 2019). En iyi model için, genellikle en yüksek belirleme katsayısı (R^2) ve en düşük RMSE değerleri seçilmelidir.

Modelin diğer performans parametreleri ise Q-Residuals ve Hotelling's T^2 'dir. PCA analizinde sistemdeki anormal davranışları tespit etmek için yaygın olarak bilinen iki istatistiksel parametre kullanılmaktadır. Bunlar Q-Residuals ve Hotelling's T^2 istatistiğidir. Q-istatistiği, temel bileşenler modeli tarafından açıklanmayan olayların değişimini ifade etmektedir. Bu, bir numunenin modele yansıtılması arasındaki farkın bir ölçüsüdür. Hotelling's T^2 istatistiği ise, çok değişkenli hipotez testlerinde kullanılan student-t istatistiği olup Q istatistiği kadar hassas değildir. T^2 büyük varyansa sahiptir, bu nedenle sistemdeki büyük değişiklikleri tespit ederken, Q istatistiği küçük

değişikliklerin gözlenmesine olanak sağlamaktadır. (Mujica ve ark., 2011). Hotelling's T^2 'si her bir numunenin varyasyonunu gösterirken, Q-Residuals değeri sapan verileri bulmaya yardımcı olan çok düşük bir skordur. Optimum model için Q-Residuals değeri %0 ve Hotelling's T^2 değeri %100'dür. Ancak modelin performansını değerlendirirken tek bir parametrenin sonucuna bakılarak ön işlem seçimi yapmak uygun ve yeterli değildir, model seçilirken birkaç parametreye birden beraber gözden geçirilmesi R^2 değerinin yüksek olması, RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin düşük olması gibi parametrelerin değerlendirilmesine dikkat edilmelidir (Temiz, 2019).

PLSR model seçilirken dikkat edilmesi gereken diğer bir performans parameresi ise tespit limiti (limit of detection, LOD) ve tayin limiti (limit of quantification, LOQ) dir. Belirtilen güvenilirlik seviyesi ile tespit edilebilen veya ölçülebilen en düşük analit konsantrasyon LOD olarak tanımlanırken, LOQ numuneyi ölçme yeteneğini temsil eden gerçek minimum değerdir. LOQ, LOD'den daha yüksek bir konsantrasyondadır (Armbruster, Tillman ve Hubbs, 1994). Kalibrasyon eğrisinin eğimi (e) ile en düşük konsantrasyondaki değer in standart sapması (sp) ile hesaplanmaktadır (Long ve Winefordner, 1983). LOD için sabit değer (k_1) 3.3 iken, LOQ için k_2 değeri 10'dur. LOD ve LOQ değerleri Eşitlik 5 ve 6 göre hesaplanmaktadır.

$$LOD = \frac{(k_1 \times sp)}{e} \quad \text{Eş. 5}$$

$$LOQ = \frac{(k_2 \times sp)}{e} \quad \text{Eş. 6}$$

2.5. Tez Çalışmasının Amaçları

Bu çalışmanın amacı; tüketicinin tağşiş yoluyla aldatılmasını önlemek, üreticiler arası haksız rekabetin önüne geçebilmek ve dürüst üreticiyi korumak için, ekmeçlik ve makarnalık buğdayların birbirinden ayrılması, karışım unlarda ve makarna da tağşiş in tespiti için klasik yöntemlerin yerine yeni metotların geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması ihtiyacını karşılamaktır. Bu doğrultuda çeşitli kemometrik yöntemlerle kombine edilmiş bazı spektroskopik yöntemlerin ve kromatografik analizlerin başarısı araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Örnekleri

Tezin ön deneme aşamasında materyal olarak Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden alınan aynı bölgede yetiştirilmiş 4 makarnalık ve 4 ekmeklik buğday, un ve irmiğe öğütülmüş, partikül boyutunun ayrılma üzerine etkisi incelenmiştir.

Tezin ilk aşamasında Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetiştirilmiş 120 ekmeklik ve 119 makarnalık buğday örneği Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından temin edilmiştir. Ekmeklik buğday örneklerinin 18 adeti Ulaş/Sivas, 19 adeti Gözlü/Konya, 25 adeti Malya/Kırşehir, 7 adeti Gölbaşı/Ankara ve 51 adeti İkizce/Ankara lokasyonlarından alınmıştır. Makarnalık buğday örneklerinin ise 24 adeti Ulaş/Sivas, 24 adeti Gözlü/Konya, 24 adeti Altınova/Konya, 24 adeti Malya/Kırşehir ve 23 adeti Haymana/Ankara lokasyonlarından sağlanmıştır.

Buğdaylar havalı temizleme cihazı kullanılarak temizlenmiştir. Buğdayların öğütme işlemi ise laboratuvar tipi valsli değirmende (Bastak 4000, Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Öğütme sonrasında un ve kepek iki ayrı haznedan alınmıştır. 4000 valsli değirmen buğday kalitesine bağlı olarak % 50–75 un verime sahiptir.

3.1.2. Paçal Un Örnekleri

Tezin ikinci aşamasında paçal un karışımları oluşturulmuştur. Ekmeklik buğday unu örneklerinin (120 adet) spektroskopik cihazlardan elde edilen verileri kullanılarak oluşturulan PCA profillerine göre buğdayların tüm çeşitleri ve yetiştirilme lokasyonları temsil edilecek şekilde 10 adet ekmeklik buğday unu seçilmiş ve eşit miktarda karıştırılmıştır. Bu şekilde ekmeklik buğday karışım unu elde edilmiştir. Benzer şekilde 119 adet makarnalık buğday unu örneklerinin PCA profillerine göre buğdayların tüm çeşitleri ve yetiştirilme lokasyonları temsil edilecek şekilde 10 adet makarnalık buğday unu seçilmiştir. Eşit miktarda alınan 10 adet makarnalık buğday unlarının karışımı hazırlanarak makarnalık buğday unu karışımı elde edilmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğday unları karışımlarından Çizelge 3.1'de belirtilen ağırlık/ağırlık yüzde oranlarda

28 adet farklı paçal un örneği hazırlanmıştır. P1 örneği %100 makarnalık buğday unu karışımıyken, P28 %100 ekmeçlik buğday unu karışımıdır.

Çizelge 3.1. Makarnalık unlara ilave edilen ekmeçlik un yüzdesi (%)

Ekmeçlik Buğday Unu İlave Oranı (% , ağırlık/ ağırlık)	
P1	0
P2	1.0
P3	2.0
P4	3.0
P5	4.0
P6	5.0
P7	7.5
P8	10.0
P9	12.5
P10	15.0
P11	17.5
P12	20.0
P13	22.5
P14	25.0
P15	27.5
P16	30.0
P17	32.5
P18	35.0
P19	37.5
P20	40.0
P21	45.0
P22	50.0
P23	55.0
P24	60.0
P25	70.0
P26	80.0
P27	90.0
P28	100.0

3.1.3. Makarna Örnekleri

Tezin üçüncü aşamasında makarna üretimi yapılmıştır. Ankara, Sivas ve Kırşehir olmak üzere Eminbey, Kızıltan, Mirzabey, Tosunbey, Bayraktar, Esperia farklı çeşitteki makarnalık ve ekmeklik buğdaylar Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'den Ağustos-Eylül 2018 tarihleri arasında temin edilmiştir. Temizlenen 65 kg makarnalık buğday ve 45 kg ekmeklik buğday örnekleri irmik ve farinaya öğütülmüştür. İrmik öğütme ve irmik verimi tayini AACCI No:26-41 (AACCI, 1990)'e göre yapılmıştır. Öğütme işleminden önce, rutubet miktarı tespit edilen buğday örnekleri %16.5 rutubet oranında tavlansmıştır.

Tavlanan buğday örnekleri Bühler pnömatik taşıma sistemli otomatik laboratuvar tipi irmik değirmeninde (Model MLU 202D, Uzwil, İsviçre) iki paralel halinde öğütülmüştür. Daha sonra irmik örnekleri, laboratuvar ölçekli pürifayırardan (Chopin, Type: Sasseur, Villeneuve, Fransa) geçirilerek küçük kepek parçacıkları ayrılmıştır.

Makarnalık buğday irmiğine, Çizelge 3.2'de belirtilen oranlarda ekmeklik buğday irmiği (farina) ilave edilerek makarna üretilmiştir. Makarna, 2 paralelli olacak şekilde D'Egidio ve ark., 1982 tarafından önerilen yönteme göre ön yoğurucu, makarna presi ve kurutucu (Namad Firması) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Makarnalık örneklerin yüzdeleri

Farina İlave Oranı (% , ağırlık/ ağırlık)	
M1	0
M2	1.0
M3	2.0
M4	3.0
M5	4.0
M6	5.0
M7	7.5
M8	10.0
M9	12.5
M10	15.0
M11	17.5
M12	20.0
M13	22.5
M14	25.0
M15	27.5
M16	30.0
M17	32.5
M18	35.0
M19	37.5
M20	40.0
M21	45.0
M22	50.0
M23	55.0
M24	60.0
M25	70.0
M26	80.0
M27	90.0
M28	100.0

3.2. Metot

3.2.1. Kimyasal Analizler ve Renk Analizi

3.2.1.1. Rutubet ve Kül Tayini

Örneklerin rutubet ve kül miktarı, AACCI Metod No:44-15.02 (AACCI, 2000) ve AACCI Metod No:08-01.01 (AACCI,2000)'e göre belirlenmiştir.

3.2.1.2. Protein Tayini

Dumas azot analiz cihazı ile (Velp Scientifica NDA-701, İtalya) Ham Protein / Yakma Metodu, AACCI Metod No:46-30.01 (AACCI, 2000)'a göre belirlenmiştir. Protein içeriği %N x 5.7 şeklindedir. Sonuçlar %14 nem üzerinden verilmiştir.

3.2.1.3. Renk Analizi

Un örneklerinin renk analizleri Minolta Chromametre (Minolta CR-410) ile gerçekleştirilmiştir. Renk parametreleri (L*, a* ve b*) AACCI Method 14-22.01'e göre kaydedilmiştir (AACCI, 2000). Parlaklık (L*) 0-100 arasında ölçeklendirilmektedir. 0 değeri siyahken, 100 değeri beyaz anlamına gelmektedir. Kırmızı-yeşil rengin göstergesi a* değeri pozitifken kırmızılığı negatifken yeşili ifade etmektedir. Sarı-mavi rengin göstergesi olan b* değeri ise pozitifken sarı negatifken mavilikle ilgilidir.

3.2.2. Spektroskopik Analizler

Bu çalışmada örnekleri analiz etmek için NIRS, ATR-FTIRS, SFS, RS ve LIBS kullanılmıştır.

3.2.2.1. Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

NIR spektral verileri N-SENS NIR Spektrofotometresi (Nanosens A.Ş., Ankara, Türkiye) ile elde edilmiştir. Spektral aralığı, 2 nm çözünürlükte 900-1700 nm'dir.

3.2.2.2. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

ATR-FTIR spektroskopisi ölçümleri, tek sıçrama elmas kristali ve döteryumlanmış triglisin sülfat detektörü ile donatılmış Thermo Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD) spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar $400-4000\text{ cm}^{-1}$ arasında kaydedilmiştir. Her spektrum 8 cm^{-1} çözünürlükte ortalama 32 tarama ile toplanmıştır. Tüm numunelerin ATR-FTIR verileri OMNIC™ (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.2.3. Senkronize Floresans Spektroskopisi

SFS ölçümleri, bir ksenon flaş lambası kaynağı ile Varian Cary Eclipse Spektrofotometre (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) kullanılarak yapılmıştır. Dalga boyu, 10 nm 'lik adımlarla $20-100\text{ nm}$ $\Delta\lambda$ (delta değeri) ile 1 nm artışlarla 300 ve 500 nm arasında değişmiştir. En iyi ayırım 20 nm delta değeri ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4. Raman Spektroskopisi

RS ölçümleri 785 nm lazer kaynağı ile DeltaNu Examiner Raman Mikroskobu sistemi (DeltaNu Inc., Laramie, Wyoming, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Tüm numunelerin Raman spektrumları 2 cm^{-1} çözünürlükte $200-2000\text{ cm}^{-1}$ aralığında elde edilmiştir. Sabit ölçüm parametreleri integrasyon süresi 30 sn ve 100 mW lazer gücü şeklindedir ve her örnek için 3 deneme olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.2.5. Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

LIBS, Litron Nano SG 150 mJ Nd: YAG lazer (Warwickshire, İngiltere) ve Spectra 5 kanallı Aurora LIBS spektrometresi (Fremont, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Spektrumlar $186-888\text{ nm}$ arasında kaydedilmiştir. LIBS sisteminin kurulumu lazer güç kaynağı ve kontrolörü, spektrometre, 1064 nm lazer, ayna ve bilgisayara sahiptir. Lazer, Q-anahtarlı modda 8 Hz ve 40 mJ / atışlı tekrar hızında çalıştırılmıştır (Sezer ve ark., 2017).

3.2.3. Kromatografik Analiz

Gliadin proteinlerinin ekstraksiyonu ve ayrılması için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanılmıştır. Örneklerin ekstrakte edilmesi amacıyla 750 µl %70'lik etanol kullanılmıştır. Numuneler, bir ısıtma bloğu (Eppendorf Thermomixer R) kullanılarak 30°C'de 1 saat boyunca 1.400 rpm'de çalkalanmış, 4.550 xg hızda 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş (Eppendorf Santrifüj) ve 0.45 µm'lik bir naylon filtreden (VWR International, Radnor, PA, ABD) süzülmüştür. Süzüntü 3 dakika boyunca 80°C'de bir ısıtma bloğunda sallanmadan ısıtılmıştır. İki tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon A, %95 su, %5 asetonitril ve %0.1 Trifluoroasetik asitten (TFA, h/h) oluşurken, Tampon B, % 0.08 TFA ile % 100 asetonitrilden hazırlanmıştır.

Sinyali tespit etmek için Agilent 1100 değişken dalga boyu dedektörü (Agilent Technologies) ile bir Agilent Zorbax 300SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 65°C'de tutulmuştur (Lookhart ve Bean, 1995; Malalgoda ve ark., 2018).

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Kimyasal verilerin istatistiksel analizi, SAS yazılımı (Sürüm 9.4; SAS Enstitüsü, Cary, NC, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) tamamen rastgele tasarım (CRD) veya rastgele tam blok tasarımı (RCBD) ile gerçekleştirilmiştir. Farklar önemli bulunduğu anda ortalamalar LSD testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Spektroskopik ve kromatografik analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi için toplanan veriler MATLAB'ın toolbox (Windows 7 için Version Solo 6.5, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, ABD) PCA, PLS-DA ve PLSR kemometrik yöntemlerle analiz edilmiştir. Toplanan veriler kalibrasyon ve tahmin gruplarına bölünmüştür. En iyi performansı gösteren modeli seçmek amacıyla ham verilere çeşitli ön işlemler uygulanmıştır. Kullanılan ön işlemlere örnek olarak otomatik ölçeklendirme, yonsemeyi giderme, türevlendirme, düzleştirme, ortalama merkez vb. verilebilir. En iyi ayrımı ve taşıyış oranını gösteren modele performans parametrelerine göre karar verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kimyasal Analizler ve Renk Analizi Sonuçları

Ekmeklik buğday unlarının yetiştirildikleri lokasyona göre ortalama nem, kül, protein ve renk sonuçları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Ekmeklik buğday unlarında en düşük kül miktarının %0.44 ile Gölbaşı bölgesinde yetiştirilen ürünlerde olduğu saptanmıştır. En yüksek kül içeriği ise Kırşehir ve Konya bölgesinde yetiştirilen buğdaylardadır. En yüksek protein içeriği %16.2 ile Konya lokasyonuna aitken, en düşük protein içeriği %9.4 ile Sivas yöresinden yetiştirilen buğdaylara ait olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Ekmeklik buğday unlarının ortalama kimyasal özellikleri ve renk değerleri

Lokasyon	Nem (%)	Kül (%)	Protein (% , Nx5.7)	L*	a*	b*
Gölbaşı/Ankara	10.5	0.44	10.9	91.7	-1.0	7.5
İkizce/Ankara	10.4	0.50	11.3	91.1	-1.1	8.8
Kırşehir	10.6	0.52	14.3	90.6	-0.9	8.8
Konya	10.5	0.52	16.2	89.7	-0.7	9.1
Sivas	10.7	0.48	9.4	90.9	-1.2	9.1

Kül ve protein analiz sonuçları %14 rutubet esasına göre verilmiştir.

Un örneklerindeki parlaklık ve kırmızılık parametresi incelendiğinde en düşük L* ve a* değerlerinin 89.7 ve -0.7 ile Konya lokasyonunda yetiştirilen buğdaylara ait olduğu tespit edilmiştir. En yüksek sarılık b* değerleri 9.1 ile Konya ve Sivas bölgelerinde yetiştirilen buğdaylarda görülmüştür. İkizce/Ankara ve Kırşehir bölgesindeki b* değerleri ise aynı çıkmıştır.

Makarnalık buğday ununun yetiştirildikleri konuma göre ortalama nem, kül, protein ve renk sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Kül miktarları karşılaştırıldığında en yüksek kül miktarı %0.85 ile Sivas bölgesine aitken en yüksek kül değeri %1.01 Kırşehir lokasyonuna aittir. Ekmeklik buğday unlarında olduğu gibi Sivas’tan yetiştirilen makarnalık buğdaylar da en düşük protein miktarı (%9.3) tespit edilmiştir. En yüksek protein içeriği ise %16.6 değeri ile Gözülü/Konya lokasyonuna aittir. Altınova ve Gözülü/Konya lokasyonlarındaki örneklerin protein içeriği birbirine çok yakındır. En

yüksek a* değeri 2.1 ile Sivas bölgesindeki buğdaylara aitken, tüm lokasyonlardaki buğday unlarının L* ve b* değerleri arasında önemli bir fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.2. Makarnalık buğday unlarının ortalama kimyasal özellikleri ve renk değerleri

Lokasyon	Nem (%)	Kül (%)	Protein (% , Nx5.7)	L*	a*	b*
Altınova/Konya	10.2	0.89	16.3	87.3	-1.5	16.1
Ankara	10.2	0.93	13.2	87.6	-1.8	16.7
Gözlü/ Konya	10.0	0.96	16.6	86.6	-1.4	15.9
Kırşehir	10.2	1.01	15.5	87.5	-1.7	16.5
Sivas	10.6	0.85	9.3	88.5	-2.1	15.4

Kül ve protein analiz sonuçları %14 rutubet esasına göre verilmiştir.

Paçal buğday unlarının ortalama kül, nem, protein ve renk sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Ekmeklik buğday unu ilavesi ile kül, protein, a* ve b* değerleri azalırken, L* değerinin arttığı tespit edilmiştir. Ekmeklik buğday unu ilavesi ile unların rengi açılarak parlaklaşmaktadır.

Çizelge 4.3. Paçal unların kimyasal özellikleri ve renk değerleri

Örnekler	Nem (%)	Kül (%)	Protein (% _{Nx5.7})	L*	a*	b*
P1	10.1	0.95	12.8	87.1	-1.7	16.6
P2	10.3	0.95	13.4	86.5	-1.7	16.4
P3	10.3	0.94	13.1	87.2	-1.7	16.5
P4	10.5	0.95	13.1	87.1	-1.7	16.3
P5	10.4	0.92	12.9	87.9	-1.7	16.2
P6	10.3	0.91	13.0	87.5	-1.7	16.2
P7	10.2	0.89	12.1	87.5	-1.7	16.0
P8	10.5	0.89	13.6	87.6	-1.7	15.7
P9	10.6	0.90	13.0	87.5	-1.7	15.6
P10	10.9	0.88	13.3	87.6	-1.6	15.4
P11	10.4	0.86	12.8	87.2	-1.6	15.0
P12	10.4	0.83	12.7	87.9	-1.6	15.1
P13	10.5	0.80	12.5	88.3	-1.6	14.7
P14	10.5	0.82	12.3	87.9	-1.6	14.7
P15	10.6	0.83	12.7	87.9	-1.6	14.5
P16	10.8	0.80	12.8	88.6	-1.6	14.2
P17	10.7	0.80	12.7	88.6	-1.6	14.1
P18	11.0	0.83	12.9	88.6	-1.5	13.7
P19	10.8	0.76	12.8	89.1	-1.5	13.6
P20	10.9	0.75	12.6	88.9	-1.6	13.7
P21	10.9	0.79	12.7	89.1	-1.5	13.2
P22	10.7	0.72	12.6	89.4	-1.5	12.8
P23	10.6	0.73	12.5	89.3	-1.4	12.4
P24	10.8	0.69	12.2	89.8	-1.4	12.0
P25	10.7	0.64	12.0	89.3	-1.3	11.2
P26	10.8	0.56	12.1	90.2	-1.3	10.5
P27	11.3	0.53	11.9	90.7	-1.1	9.4
P28	10.9	0.43	11.7	91.1	-1.1	9.0

Kül ve protein analiz sonuçları %14 rutubet esasına göre verilmiştir.

Makarnaların ortalama nem, kül, protein ve renk sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ekmeklik buğday unu ilavesinde elde edilen sonuçlara benzer ekmeklik buğday irmiği (farina) ilavesi ile olarak kül, protein ve b* değerleri azalırken, L* değerinin arttığı tespit edilmiştir.

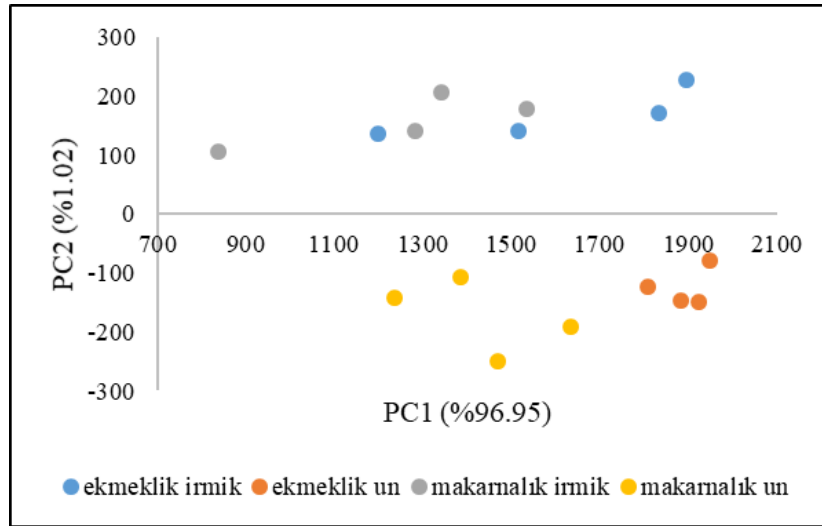
Çizelge 4.4. Makarna örneklerinin kimyasal özellikleri ve renk değerleri

Örnekler	Nem (%)	Kül (%)	Protein (% _{Nx5.7})	L*	a*	b*
M1	9.8	0.58	10.4	83.8	-2.2	22.0
M2	9.7	0.60	10.2	84.4	-2.4	22.3
M3	10.0	0.57	10.4	85.2	-2.4	21.6
M4	10.0	0.61	10.1	85.4	-2.4	21.9
M5	10.0	0.64	10.2	85.8	-2.4	21.3
M6	9.9	0.58	10.1	85.1	-2.2	21.4
M7	9.7	0.57	9.9	85.1	-2.3	21.5
M8	9.7	0.57	10.0	85.4	-2.4	21.0
M9	9.7	0.54	10.0	85.1	-2.3	21.2
M10	9.6	0.51	9.7	84.6	-2.1	19.9
M11	9.9	0.57	10.0	85.5	-2.2	21.4
M12	9.6	0.58	9.9	84.5	-2.2	20.7
M13	9.7	0.56	9.6	85.7	-2.2	19.6
M14	9.8	0.55	9.8	85.4	-2.1	18.9
M15	10.0	0.49	9.8	85.4	-2.0	18.5
M16	9.9	0.53	9.9	85.4	-2.0	20.2
M17	9.9	0.57	10.0	85.9	-1.9	18.7
M18	9.7	0.56	9.7	85.2	-1.9	19.0
M19	9.4	0.50	9.8	85.3	-1.9	18.1
M20	9.7	0.54	9.9	85.0	-1.9	19.5
M21	9.6	0.53	9.7	85.5	-1.8	18.2
M22	9.5	0.52	9.7	85.5	-1.7	17.3
M23	9.7	0.54	9.6	85.4	-1.7	17.8
M24	9.7	0.50	9.5	86.0	-1.7	17.1
M25	9.7	0.47	9.3	85.5	-1.5	17.1
M26	9.8	0.44	9.2	84.4	-1.2	15.7
M27	9.7	0.41	8.8	85.0	-1.0	14.5
M28	9.5	0.40	8.8	85.6	-0.8	13.3
LSD (p<0.05)	0.3	0.05	0.3	0.0	0.0	0.0

Kül ve protein analiz sonuçları %14 rutubet esasına göre verilmiştir.

4.2. Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Unların Spektroskopik ve Kromatografik Analiz Sonuçları

Araştırmanın ön deneme aşamasında buğdayın partikül boyutunun analiz sonuçlarına etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla 4 ekmeklik ve 4 makarnalık buğday un ve irmik boyutunda değirmende öğütülmüştür. Tüm spektroskopik yöntemlerde un boyutunun irmik boyutuna göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Örnek olarak Raman spektroskopisine ait PCA model skor grafiği Şekil 4.1 ile verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere un örnekleri kendi içinde kümeleşirken, irmik örneklerinde net bir ayırım sağlanamamış, ekmeklik irmik ve makarnalık irmik örnekleri benzer noktalarda konumlanmıştır. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda buğday örnekleri una öğütülerek kullanılmıştır. Piyasada da farına (ekmeklik buğday irmiği) ile irmik (makarnalık buğday) karışımları una öğütülerek analizi gerçekleştirilebilir.



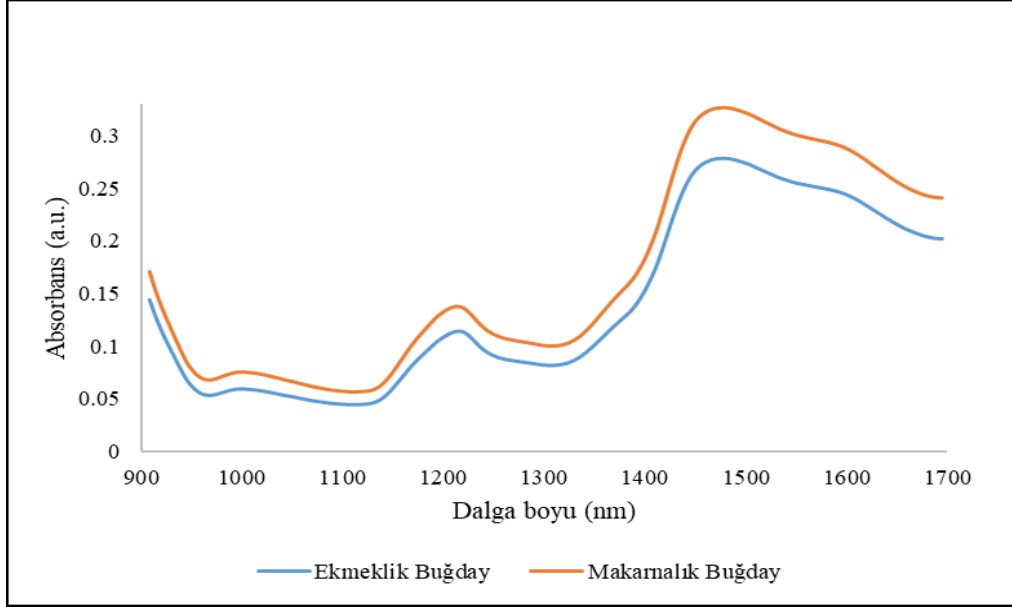
Şekil 4.1. Ekmeklik ve makarnalık irmik ve unların PCA skor grafiği

Tezin ilk aşamasında 120 ekmeklik ve 119 makarnalık buğday ununun NIRS, ATR-FTIRS, SFS, RS, LIBS ve RP-HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

NIR spektroskopisi kullanılarak elde edilen ekmeklik ve makarnalık buğday unların ortalama NIR spektrumları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Hem makarnalık hem de

ekmeklik buğday un örneklerinde benzer spektrum gözlemlenmiştir. En önemli pikler 990-1050, 1160-1270 ve 1400-1580 nm'de elde edilmiştir. Makarnalık ve ekmeklik buğday ununun spektrumları arasında önemli bir fark görülmemiştir; ancak NIR bantları farklı yoğunlukta ve şiddettedir.

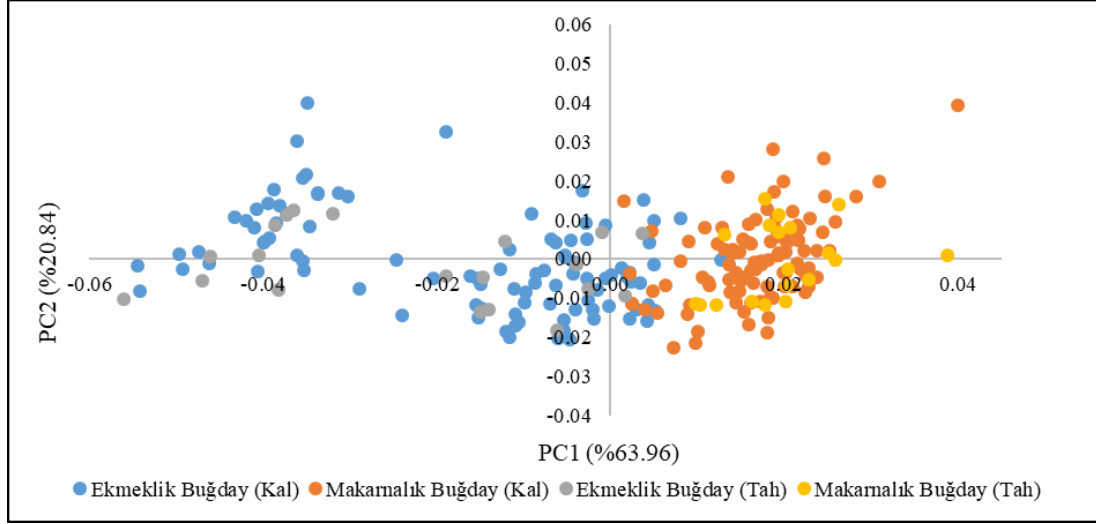


Şekil 4.2. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama NIR spektrumları

Önceki çalışmalarda da, makarnalık ve ekmeklik buğdayların ham spektrumlarının oldukça benzer olduğu bulunmuştur. İkinci türevlendirilmeden sonra, lipit ve nem içeriği bakımından buğdayların farklılıkları nedeniyle durum ve ekmeklik buğday örneklerinin ayrılması sağlanmıştır (Cocchi ve ark., 2006). NIR spektrumunda 1170-1390 nm'deki pik C-H gerilmesi hakkında bilgi verirken, 1463-1470 nm'deki pik tarım ve gıda ürünlerinde N-H bağı ile ilişkilidir (Shenk ve ark., 2001).

Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının spektrum verilerinin ayrıştırılması ve sınıflandırma başarısının incelenmesi amacıyla PCA analizi gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir. PCA analizinde düzgülendirme, türevlendirme, taban çizgisi düzeltme, normalleştirme, otomatik ölçeklendirme, merkez ortalama, GLSW gibi ön işlemler kullanılmış ve performans parametrelerine göre en iyi sonuç veren modelin GLSW olduğu saptanmıştır. Modelin PC1 toplam varyansı %63.96 iken PC2 toplam

varyansı %20.84 bulunmuştur. Şekil 4.3 de de görüldüğü üzere PCA skor grafiği incelendiğinde kalibrasyon ve tahmin verilerinin kendi içinde kümeleştiği görülmüştür ancak ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının net bir şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir.



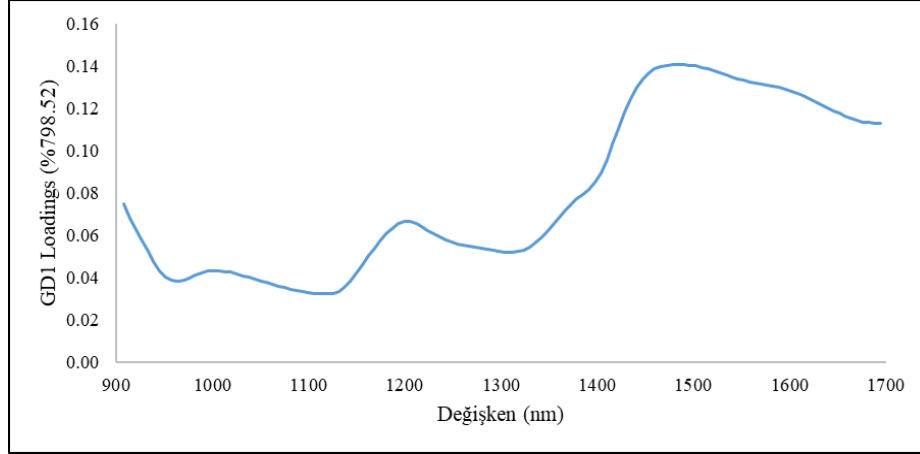
Şekil 4.3. NIR verilerine ait PCA skor grafiği

PCA modelinin sınırlı ayırım kabiliyeti göz önüne alındığında, doğru bir ayırma modeli sağlamak için PLS-DA kullanılmıştır. NIRS verileri için çeşitli ön işleme yöntemleri ile oluşturulan modellerin performans parametreleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Ön işlemsiz, tekli ya da ikili şekildeki ön işlemlilerden en uygun modeli seçmek amacıyla RMSEC, RMSECV, RMSEP, Hotelling’s T^2 ve Q-Residuals (%) değerleri incelenmiştir. Türevlendirme, yönsemeyi giderme, ortalama merkez ve normalleştirme ön işlemlerin benzer performans sonuçları verdiği görülmüştür.

Çizelge 4.5. NIRS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

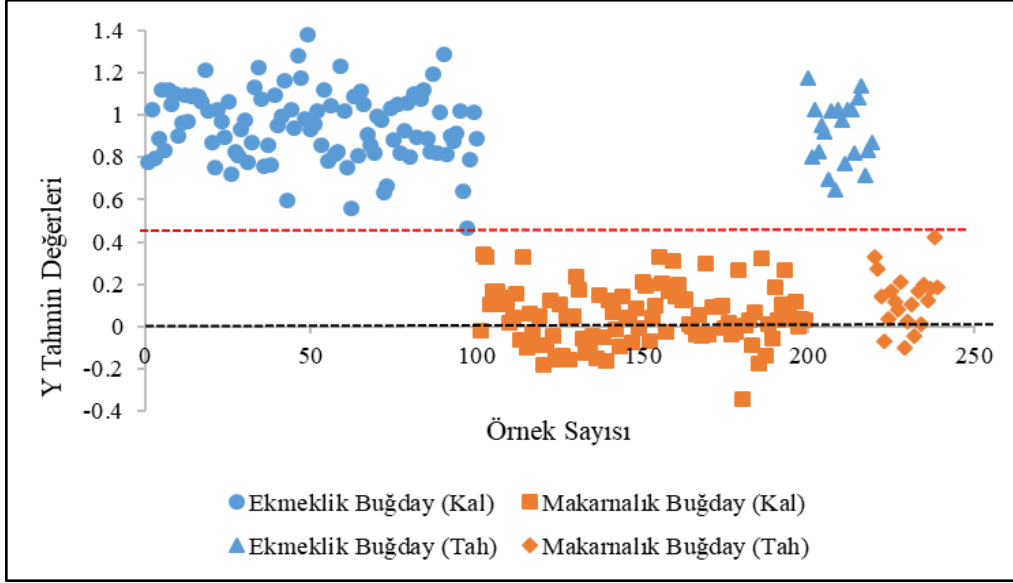
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	5	99,97	0.940	0.949	0.930	0.949	1.000	0.850	0.268	0.278	0.283	100.00	0.00
AS	4	96.72	0.930	0.960	0.930	0.960	0.900	0.750	0.281	0.292	0.321	99.87	0.13
BLC	3	99.98	0.930	0.939	0.930	0.939	0.950	0.700	0.286	0.293	0.350	99.99	0.01
DERIV	10	99.90	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.164	0.176	0.172	100.00	0.00
DET	8	99.96	0.990	1.000	0.990	0.990	1.000	1.000	0.186	0.199	0.178	100.00	0.00
MC	10	98.52	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.158	0.175	0.174	100.00	0.00
NORM	10	99.89	0.990	1.000	0.990	0.990	1.000	1.000	0.170	0.188	0.185	100.00	0.00
SMO	8	99.97	0.970	0.970	0.940	0.960	1.000	0.800	0.264	0.274	0.323	100.00	0.00
NORM-SMO	6	99.89	0.920	0.970	0.910	0.960	0.950	0.500	0.291	0.302	0.380	100.00	0.00
NORM-DET	6	99.96	0.950	0.949	0.930	0.960	0.950	0.850	0.258	0.272	0.318	99.99	0.01

Diğer performans değerlendirilmesi için modellerin loadings değerleri incelenmiş ve örneklerin spektrumuna en çok benzeyen model seçilmiştir. Örneklerin spektrumuna en benzeyen loading değerinin ortalama merkezleştirme (mean center) modelinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. NIRS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

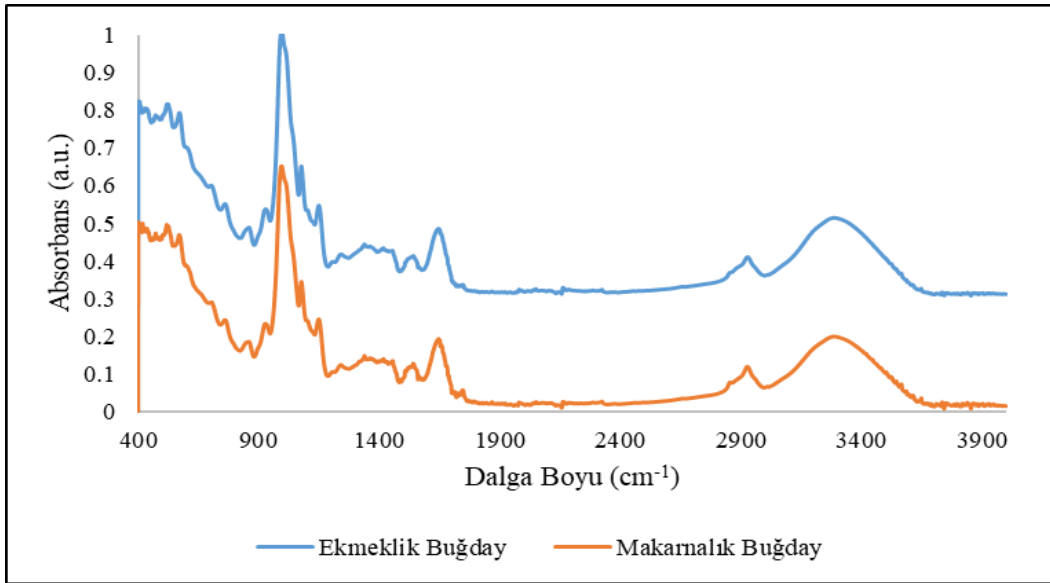
En iyi model olan ortalama merkezleştirme ön işleminin PLS-DA skor grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. NIR spektroskopisi ile ekmeklik ve makarnalık buğday unu örneklerinin birbirinden açıkça ayrıldığı görülmektedir. Ekmeklik buğday ununun bir örneği hariç tüm örneklerin kalibrasyon ve tahmin verileri, eşik çizgisinin üst kısmında ayrı olarak yer almaktadır. Makarnalık buğday unu örneklerinin kalibrasyon ve tahmin verileri de eşik çizgisinin alt kısmına belirgin bir şekilde yerleşmiştir. Hotelling's T^2 değeri 100.00 olan PLS-DA modelinin, RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin kantitatif parametreleri, 0.158, 0.175 ve 0.174'tür. Çapraz validasyon duyarlılığı ve özgüllüğü oranı 0.990 ve 1.000 olarak bulunmuştur. Modelin tahmin matrisi incelediğinde çapraz validasyon veri kümesinde 1 tane ekmeklik buğday ununun makarnalık olarak sınıflandırıldığı görülmüştür. Genel olarak NIR spektroskopisi ile ekmeklik ve makarnalık buğday unu örneklerinin ayırt edilmesinin oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.5. NIRS verilerine ait PLS-DA skor grafikleri

4.2.2. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüştürülmü Kızılötesi Spektroskopisi

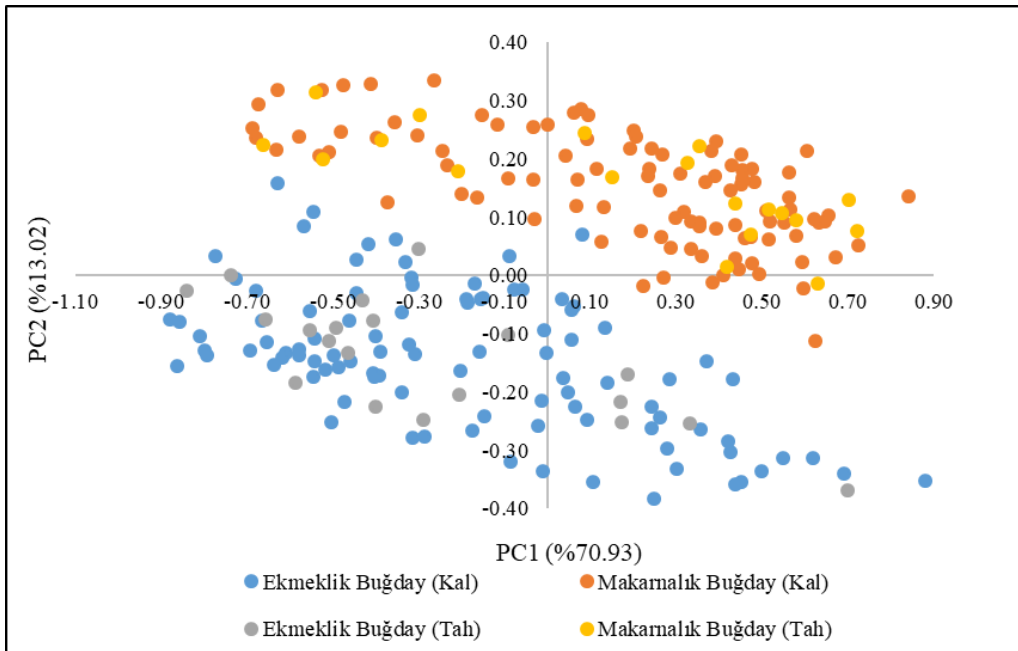
ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak elde edilen 120 ekmeklik ve 119 makarnalık buğday ununun ortalama ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğday örneklerinin ATR-FTIR spektrumları 400 ila 4000 cm^{-1} arasında toplanmıştır. Örneklerin spektrumlarının benzer olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama ATR-FTIR spektrumları

Literatürle uyumlu olarak 760-858 cm^{-1} , 930 -1078 cm^{-1} , 1540-1640 cm^{-1} ve 2930-3290 cm^{-1} dalga boylarında önemli pikler görülmüştür. 750-950 cm^{-1} 'deki pik, nişasta bileşeninden dolayı gözlenmektedir. 800-1200 cm^{-1} 'deki pikler polisakkaritlerin varlığını gösterirken, 1035-1047 cm^{-1} pik C-OH ile ilişkilidir. 977-986 cm^{-1} ve 1100-1200 cm^{-1} 'de pikleri C-O ile ilgilidir. 1541 ve 1648 cm^{-1} 'deki pikler protein içeriğiyle bağlantılıdır. 2800-3050 cm^{-1} 'deki pikler C-H hakkında bilgi vermektedir (Kačuráková, 1999; Barron ve Rouau, 2008).

Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının spektrum verilerinin ayrıştırılması ve sınıflandırma başarısının incelenmesi amacıyla PCA analizi gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. PCA analizinde düzgünleştirme, türevlendirme, taban çizgisi düzeltilmesi, normalleştirme, otomatik ölçeklendirme, ortalama merkez, GLSW gibi ön işlemler kullanılmış ve performans parametrelerine göre en iyi sonuç veren modelin MSC+MC olduğu saptanmıştır. Modelin PC1 toplam varyansı %70.93 iken PC2 toplam varyansı %13.02 bulunmuştur. Ancak bazı ekmeklik buğday kalibrasyon verilerinin makarnalık buğday verilerine yakın noktada konumlandığı görülmektedir. Bu nedenle verilerin yüksek istatistiksel performans ile ayrılması ve sınıflandırılması amacıyla PLS-DA analizi gerçekleştirilmiştir.



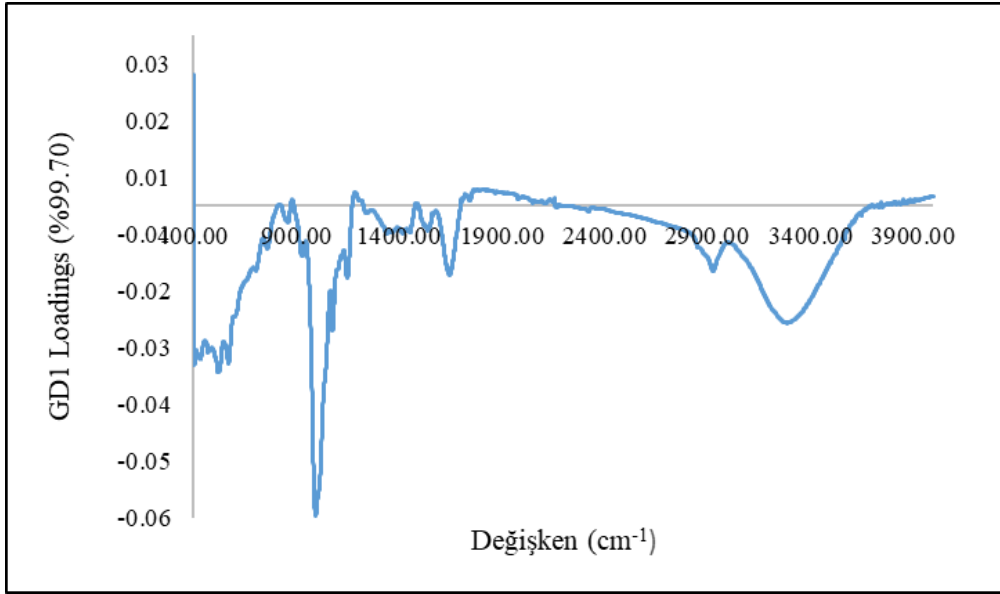
Şekil 4.7. ATR-FTIRS verilerine ait PCA skor grafiği

Ekmeklik ve makarnalık buğday örneklerinin ATR-FTIR verileri için çeşitli ön işlemler kullanılmış ve oluşturulan modellerin performans parametreleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Ön işlemsiz, tekli ya da ikili şekildeki ön işlemlerden en uygun modeli seçmek amacıyla RMSEC, RMSECV, RMSEP, Hotelling's T^2 ve Q-Residuals (%) değerleri incelenmiştir. En düşük RMSEP değeri otomatik ölçeklendirme ön işlemine ait olmasına rağmen AS ön işleminde %GD1 ve Hotelling's T^2 değerleri uygun değildir. Bu nedenle %GD1 ve Hotelling's T^2 değerleri uygun ve spektruma en yakın loading değerine sahip taban çizgisi düzeltmesi ön işlemi seçilmiştir. Modelin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.186, 0.190 ve 0.146 bulunmuştur. Özellikle, ekmeklik buğday unu örneklerinin kalibrasyon ve tahmin verilerinin ile durum buğday unu örneklerinden net bir şekilde başarıyla ayrılmıştır. Modelin Hotelling's T^2 değeri 99.98 iken, Q-Residuals değeri 0.02'dir.

Çizelge 4.6. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

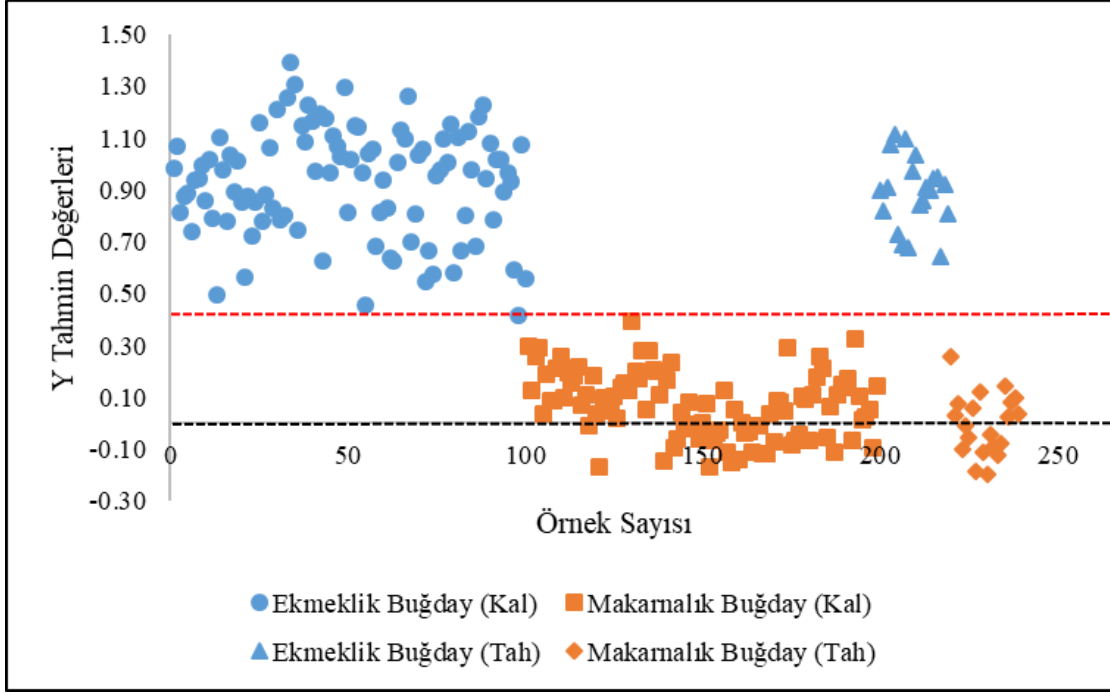
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	3	99.77	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.210	0.213	0.236	99.98	0.02
AS	3	39.45	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.174	0.179	0.117	87.40	12.60
BLC	4	99.70	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.186	0.190	0.146	99.98	0.02
DERIV	4	99.57	1.000	0.990	1.000	0.980	0.900	1.000	0.191	0.202	0.282	99.89	0.11
DET	3	99.71	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.190	0.194	0.151	99.96	0.04
MC	3	69.59	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.209	0.214	0.179	94.02	5.98
NORM	3	99.69	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.205	0.208	0.228	99.98	0.02
SMO	3	99.77	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.210	0.213	0.230	99.98	0.02
NORM-SMO	3	99.69	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.204	0.208	0.222	99.98	0.02
NORM-DET	3	99.54	1.000	0.960	1.000	0.960	0.850	1.000	0.237	0.249	0.272	99.86	0.14

Taban çizgisi düzeltilmesi modeline ait loadings değeri Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

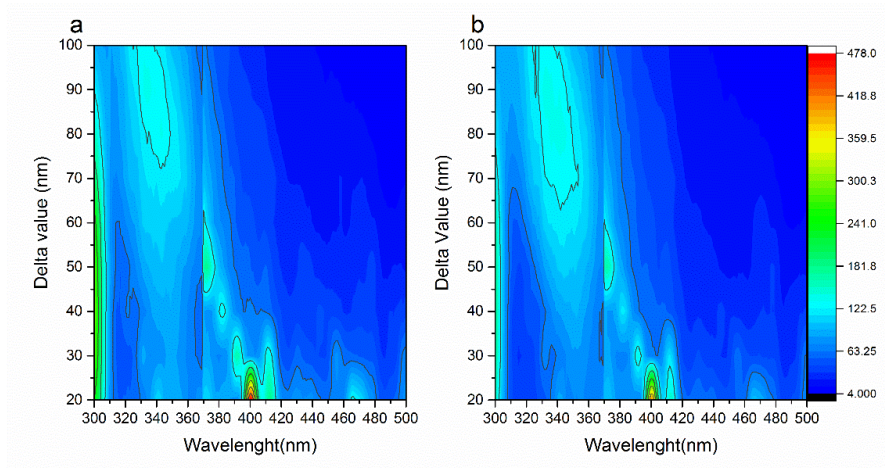
Şekil 4.9’da görüldüğü gibi PLS-DA skor grafiğinde verilerin kümeleşmesi çok tatmin edicidir. Çapraz validasyonun duyarlılık ve özgüllük değerleri ise oldukça yüksek olup 0.990 ve 1.000 şeklindedir. NIR spektroskopisine benzer şekilde modelin tahmin matrisi incelediğinde çapraz validasyon veri kümesinde 1 tane ekmeklik buğday ununun makarnalık olarak yanlış sınıflandırıldığı görülmüştür. Genel olarak ATR-FTIR spektroskopisi ile ekmeklik ve makarnalık buğday unu örneklerinin ayırt edilmesinin oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.9. ATR-FTIRS verilerine ait PLS-DA skor grafiği

4.2.3. Senkronize Floresans Spektroskopisi

Durum ve ekmeklik buğday numunelerinin spektrumları 20-100 nm ile 300 ve 500 nm dalga boyları arasında toplanmıştır. Ortalama SF spektrumları Şekil 4.10'da verilmiştir. Durum ve ekmeklik buğday unu örneklerinin pik pozisyonları $\Delta\lambda = 20$ nm için 342-370 nm, 400-415 nm ve 467 nm'dir.

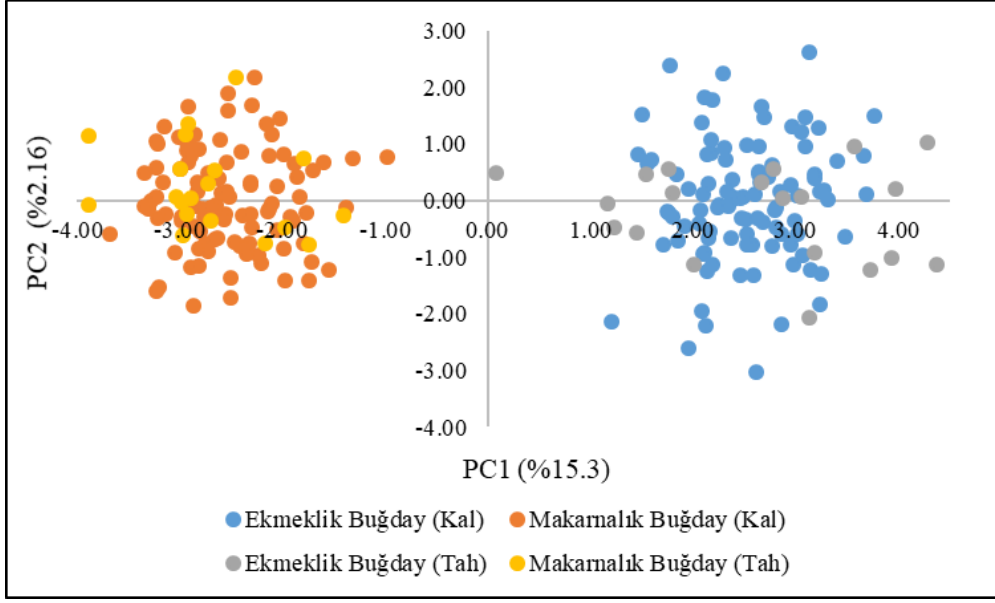


Şekil 4.10. Ekmeklik (a) ve Makarnalık (b) Buğday Unlarının Ortalama SFS spektrumları

Ön yüz floresans spektroskopisinde buğday numunelerinin spektrumunda, 334 nm'deki pikin triptofan ve 345 nm'deki pikin gluten ile ilişkilidir. 430-530 nm arasındaki pik ise tokoferol ve karotenoidlerden kaynaklanmaktadır (Zandomeneghi, 1999; Zandomeneghi ve ark., 2000).

Makarnalık ve ekmeklik buğdayların spektrumlarının benzer eğilime sahip olduğu tespit edilirken; durum buğday unu örneklerinin bant yoğunluğunun, ekmeklik buğday unu örneklerinden daha düşük olduğu görülmüştür. Spektrum bant yoğunluğu, örneklerin fizikokimyasal ve mikro çevre özelliklerine, depolama süresine, floroforların emme özelliklerine ve floroforların konsantrasyonuna dayanmaktadır (Zandomeneghi, 1999; Zeković ve ark., 2012). Düşük nişasta ve yüksek protein içerikli örneklerin UV'ye karşı düşük protein ve yüksek nişasta örneklerine göre daha az geçirgen olduğu tespit edilmiştir. Makarnalık ve ekmeklik buğdayın yoğunluk oranındaki fark, ekmeklik ve makarnalık buğday türlerinin 275 ve 325 nm'de ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır. Ekmeklik buğdayın 275 nm'deki pik yoğunluğunun 325 nm'deki pik yoğunluğuna oranının, durum buğday örneklerinin aynı nm'deki bant yoğunluğu oranına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Yüksek floresans yoğunluğu aynı zamanda buğday proteinlerinin aromatik amino asitleri ile ilişkilidir ve düşük yoğunluk ise, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere bağlı kromoforların bir sonucudur (Zandomeneghi ve ark., 2000).

SFS verilerinin sınıflandırılması ve aykırı verilerin tespiti amacıyla PCA analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11'de verilen PCA skor grafiğinde ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının net bir şekilde ayrıldığı görülmektedir ancak PC kümülatif varyansları oldukça düşüktür. PC1'in toplam varyansı %15.3'iken, PC2'nin toplam varyans değeri %2.16'dır.



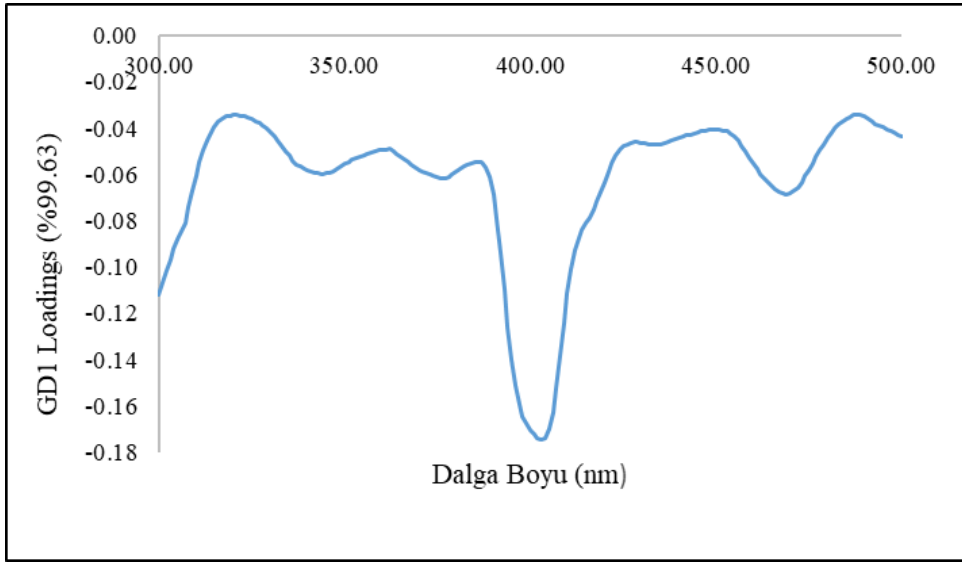
Şekil 4.11. SFS verilerine ait PCA skor grafiği

Verilerin yüksek istatistiki performans ile ayrılması ve sınıflandırılması amacıyla PLS-DA analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ön işlemler ve oluşturulan modellerin performans parametreleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Ön işlemsiz, tekli ya da ikili şekildeki ön işlemlerden en uygun modeli seçmek amacıyla RMSEC, RMSECV, RMSEP, Hotelling’s T^2 ve Q-Residuals (%) değerleri incelenmiştir. Ön işlemlerde normalleştirme ve ortalama merkez ön işlemleri incelendiğinde RMSEC, RMSECV, RMSEP değerleri daha düşük çıkmasına rağmen loading grafikleri spektrumlara benzemediği görülmüştür. Bu nedenle SFS verileri için en iyi modelin, ön işlemlerin düzleştirilmesiyle oluşturulduğu tespit edilmiştir. Modelin Hotelling’s T^2 değeri 100.00 bulunmuştur. Kantitatif parametreleri RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.164, 0.171 ve 0.194’tür. Buğday örneklerinin kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin gruplarının duyarlılık ve özgüllük değerleri 1.000’dir.

Çizelge 4.7. SFS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

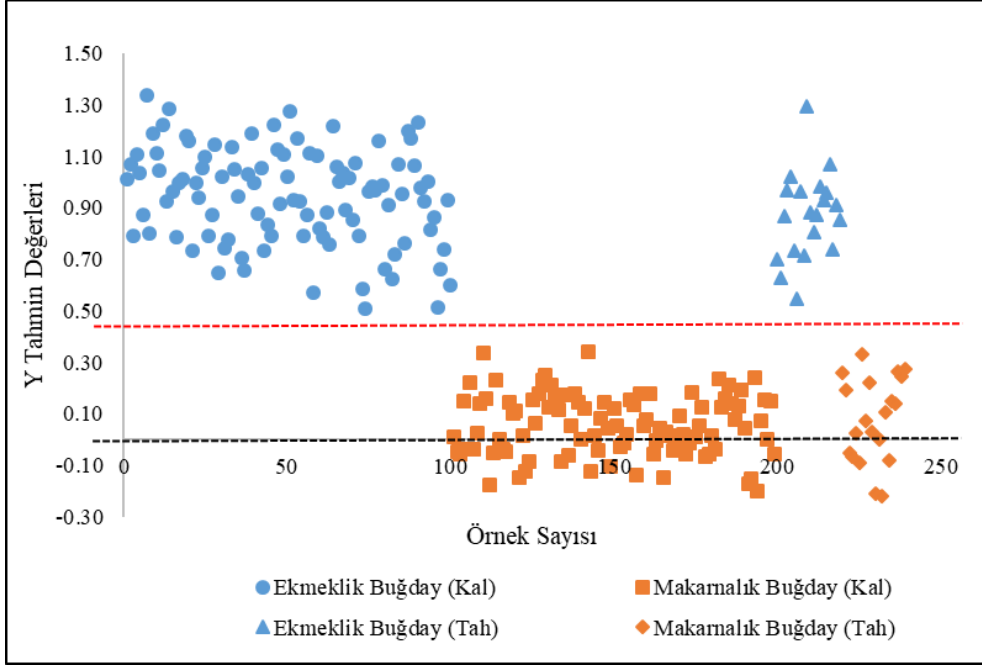
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	4	99.62	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.216	0.224	0.215	99.98	0.02
AS	4	95.47	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.161	0.169	0.191	99.34	0.66
BLC	4	99.37	0.980	1.000	0.980	0.990	1.000	1.000	0.227	0.234	0.212	99.95	0.05
DERIV	4	99.60	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.172	0.181	0.211	99.96	0.04
DET	4	99.28	0.990	0.990	0.990	0.980	1.000	1.000	0.193	0.204	0.212	99.95	0.05
MC	5	94.11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.140	0.153	0.181	99.64	0.36
NORM	5	7.68	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.138	0.148	0.188	99.99	0.01
SMO	5	99.63	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.164	0.171	0.194	100.00	0.00
NORM-SMO	5	6.39	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.156	0.162	0.203	100.00	0.00
NORM-DET	4	30.03	0.990	1.000	0.990	0.990	1.000	1.000	0.183	0.193	0.219	99.96	0.04

Modele ait loadings grafiği Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. SFS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

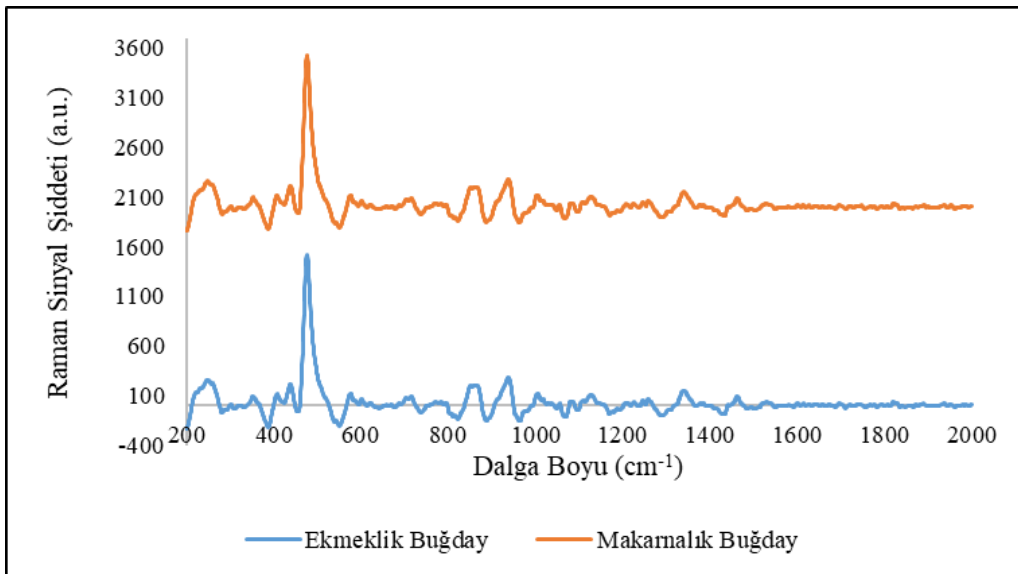
Modelin PLS-DA skoru Şekil 4.13’de verilmiştir. Ekmeklik buğday unu örneklerinin hem kalibrasyon hem de tahmin verileri, eşik çizgisinin st kısmında ayrı olarak yer almaktadır. Makarnalık buğday unu örneklerinin kalibrasyon ve tahmin verileri de eşik çizgisinin alt kısmına belirgin bir Şekilde yerleşmiştir. Modelin tahmin matrisi incelediğinde sınıflandırma hatası değerlerinin sıfır olmasıyla tüm örneklerin etkileyici bir başarıyla ayrıldığı ve doğru sınıflandırıldığı görülmüştür. Herhangi bir yanlış sınıflandırılan örnek bulunmamaktadır. SFS'nin, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile durum ve ekmeklik buğday örneklerinin ayrılmasında en etkili yöntem olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13. SFS verilerine ait PLS-DA skor grafiği

4.2.4. Raman Spektroskopisi

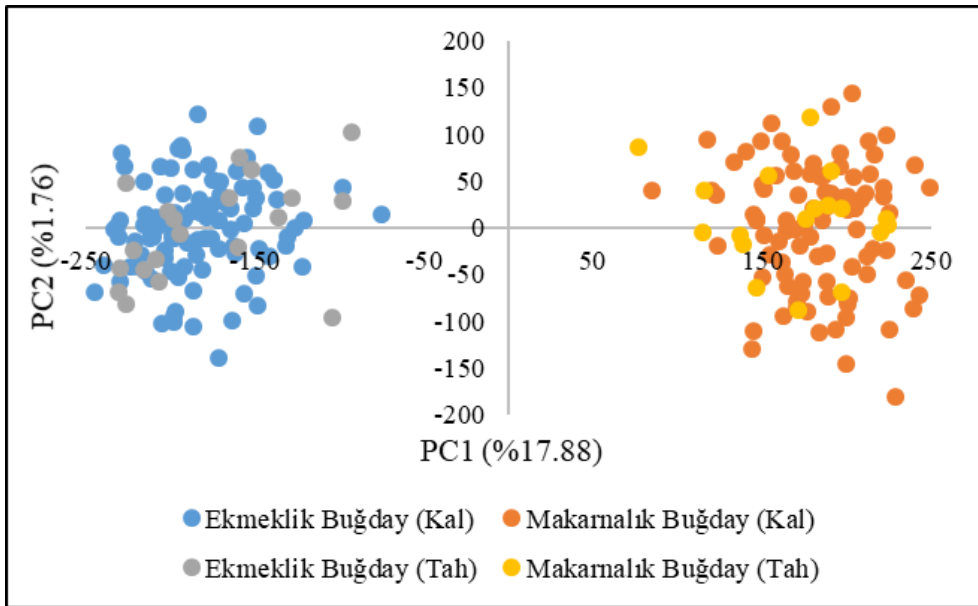
Ekmeklik ve makarnalık buğdaylarının 200-2000 cm^{-1} de elde edilen Raman spektrumları Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğday unları için ana pikler 254 cm^{-1} , 475 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 940 cm^{-1} ve 1340 cm^{-1} de elde edilmiştir. Makarnalık ve ekmeklik buğdayların spektrumları genel olarak oldukça benzer olup piklerin yoğunlukları farklıdır.



Şekil 4.14. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama RS spektrumları

Daha önceki çalışmalarda buğday unlarının Raman spektrumlarında 280 cm^{-1} , $480\text{-}580\text{ cm}^{-1}$, 940 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} ve $1130\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ 'de pikler gözlenmiştir (Piot ve ark., 2001; Scudiero ve Morris, 2010). 280 cm^{-1} 'de bulunan pik ekmeklik yumuşak ve sert buğday unlarındaki C-C bağları hakkında bilgi vermektedir (Scudiero ve Morris, 2010). Un numunelerinin spektrumlarında gözlenen 500 ve $850\text{-}860\text{ cm}^{-1}$ 'deki piklerin, nişasta spektrumuna oldukça benzer olduğu bulunmuştur. 867 cm^{-1} ve 1302 cm^{-1} 'deki pikler, lipid zinciri ve CH_2 varlığını gösterirken, 1052 cm^{-1} ve 1095 cm^{-1} pikler, C-C ve PO^{-2} 'ye atfedilmektedir (Piot ve ark., 2001; Sivam ve ark., 2013).

Raman spektrumlarının PCA skor grafiği Şekil 4.15'de sunulmuştur. PCA analizinde etkili ayrımın GLSW ön işleminde gerçekleştiği görülmüştür. Ancak modelin PC kümülatif varyansları oldukça düşüktür. PC1'in toplam varyansı %17.88'iken, PC2'nin toplam varyans değeri %1.76'dır.



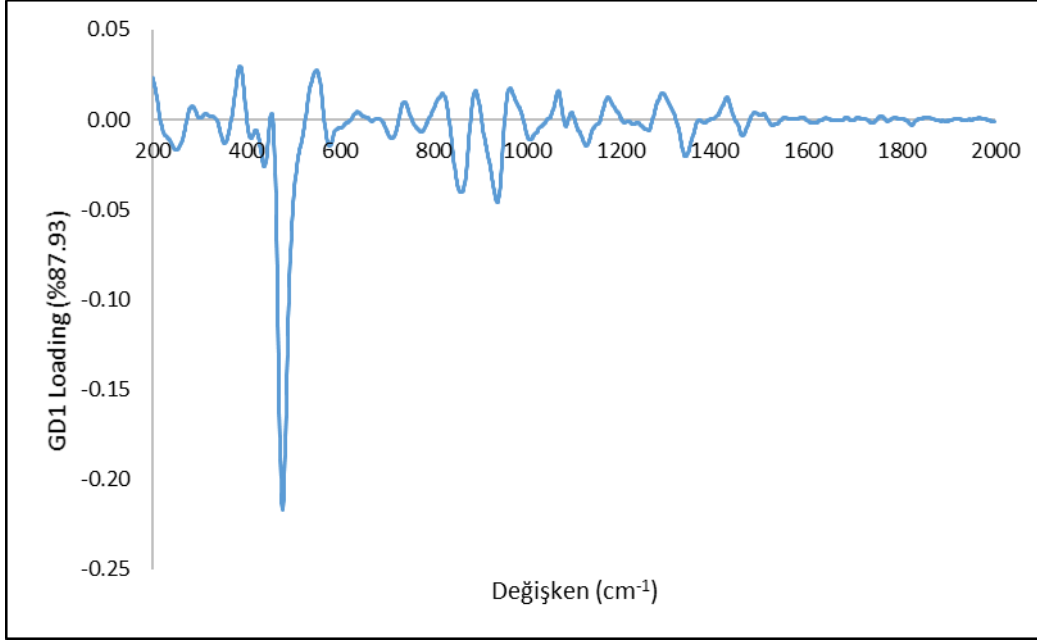
Şekil 4.15. RS verilerine ait PCA skor grafiği

Verilerin yüksek istatistiki performans ile ayrılması ve sınıflandırılması amacıyla PLS-DA analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ön işlemler ve oluşturulan modellerin performans parametreleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. RS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

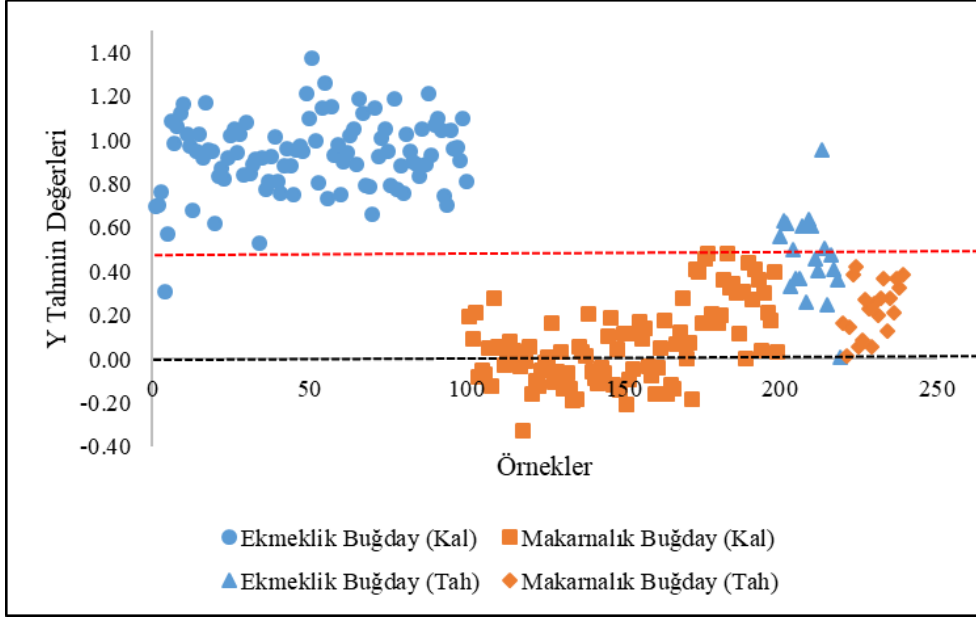
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	5	92.02	1.000	1.000	1.000	1.000	0.100	1.000	0.108	0.130	0.497	98.79	1.21
AS	2	18.88	1.000	1.000	0.990	0.990	0.000	1.000	0.123	0.139	0.518	25.96	74.04
BLC	4	93.31	0.990	1.000	0.980	1.000	0.150	1.000	0.163	0.182	0.531	99.18	0.82
DERIV	3	93.24	1.000	1.000	1.000	1.000	0.150	1.000	0.137	0.150	0.450	96.19	3.81
DET	5	91.85	1.000	1.000	0.990	1.000	0.150	1.000	0.107	0.129	0.502	98.72	1.28
MC	5	52.90	1.000	1.000	1.000	1.000	0.100	1.000	0.105	0.130	0.497	86.12	13.88
NORM	4	87.78	0.990	1.000	0.970	1.000	0.300	1.000	0.157	0.178	0.441	98.61	1.39
SMO	5	92.12	1.000	1.000	0.980	1.000	0.100	1.000	0.144	0.169	0.508	99.31	0.69
NORM-SMO	4	87.83	0.990	1.000	0.960	1.000	0.350	1.000	0.187	0.210	0.441	99.20	0.80
NORM-DET	5	86.93	1.000	1.000	0.990	1.000	0.150	1.000	0.112	0.134	0.458	98.67	1.33

RS verileri için en iyi modelin, ön işlemlerin normalleştirici ile düzgünleştirilme kombinasyonu ile elde edilmiştir. Performans parametreleri incelendiğinde RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri 0.187, 0.210 ve 0.441 şeklindedir. Hotelling's T^2 değeri ise 99.20 bulunmuştur. Modele ait loadings grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. RS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

PLS-DA skor grafiği Şekil 4.17'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere ekmeklik buğday unu kalibrasyon verilerinin bir tanesi hariç hepsi eşik çizgisi üzerinde konumlanırken tahmin verileri eşik çizgisinin üstünde ve altında olacak şekilde konumlanmıştır. Durum ve ekmeklik buğday örneklerinin validasyon verileri bazı noktalarda karışmış haldedir. Tahmin modelinin duyarlılığının kalibrasyon ve çapraz validasyon modellerinin duyarlılığından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Tahmin grubunun duyarlılığı 0.350 iken çapraz validasyon duyarlılığı ve özgülüğü 0.960 ve 1.000'dir. Modelin tahmin matrisi incelendiğinde kalibrasyon grubundaki ekmeklik buğday ununun bir tanesinin, çapraz validasyon grubundaki ekmeklik buğday ununun 4 tanesinin, tahmin grubundaki ekmeklik buğday ununun 13 tanesi yanlış bir şekilde makarnalık olarak sınıflandırılmıştır.



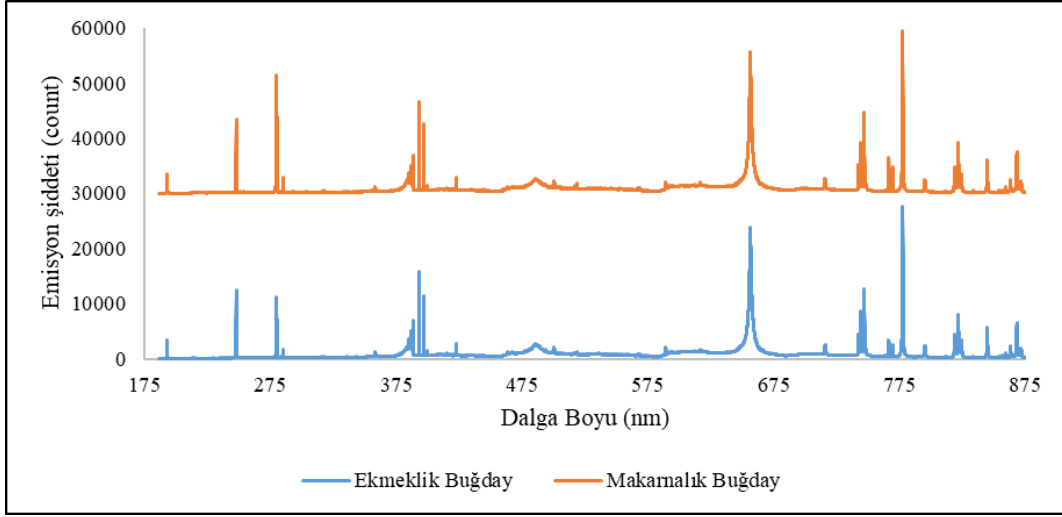
Şekil 4.17. RS verilerine ait PLS-DA modeli skor grafiği

Diğer spektroskopik cihazlarla karşılaştırıldığında Raman spektroskopisinin ayırım performansının tatmin edici olmadığı bulunmuştur. Her ne kadar bu çalışmada kullanılan ATR-FTIR, NIR, RS tekniklerinin hepsi titreşim spektroskopisi olsa da, IR yöntemler moleküler absorpsiyona dayanmaktayken, Raman yöntemi foton saçılması ile ilgilidir. Raman spektroskopisinin FTIR ve NIR spektroskopisine kıyasla daha düşük duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir. FTIR ve Raman spektroskopileri yüksek spektral çözünürlüğe sahip dar çizgi genişliklerine sahipken, NIRS geniş çizgi genişliklerine sahiptir. Raman spektroskopisi tekniği, Raman sinyallerinin zayıflığı nedeniyle sınırlıdır ve sinyal kaymalarına neden olarak floresanstan kaynaklanan interferanse sahiptir (McCreery, 2001). Raman spektroskopisinin ekmeklik ve makarnalık buğday sınıflandırılması ve ayrılmasında performansı en kötü spektroskopik metot olduğu tespit edilmiştir.

4.2.5. Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının LIBS spektrumları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğdaylarının unlarının spektrumunda 247.86, 279.56, 393.36, 656.40, 746.99, 766.57, 776.69, 777.33, 821.83, 844.72 ve 868.18 nm'de pikler gözlenmiştir. Hem durum hem de ekmeklik buğday unu örneklerinin LIBS

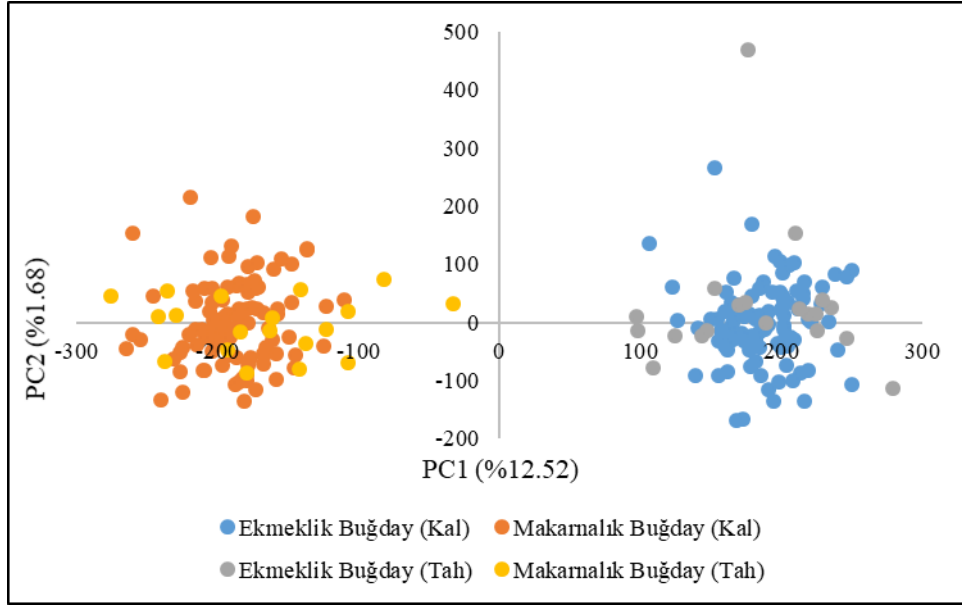
spektrumlarında benzer spektral pikler elde edilmiştir. Bununla birlikte, numunelerin spektral çizgilerinin yoğunluklarında bazı farklılıklar gözlenmiştir, makarnalık buğday ununun spektral yoğunluğunun yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin makarnalık buğday unu örneklerinin temel bileşiminin, ekmeklik buğday unu örneklerinden daha zengin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.18. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama LIBS spektrumları

Belirli elementler için spektrumlardaki bantların yerleri açısından önceki çalışmalarla önemli benzerlikler bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak; 257.610, 259.94, 279.500, 393.360, 656.618, 744.769, 747.328, 766.568, 777.224 nm'deki spektrum bantlarının sırasıyla Mn, Fe, Mg, Ca, H, N, Zn, K ve O ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Peruchi ve ark., 2014; Sezer ve ark., 2017).

LIBS verilerinin PCA skor grafiği Şekil 4.19'da sunulmuştur. PCA analizinde en etkili ayrımı GLSW ön işleminde gerçekleştirilmiştir. Diğer spektroskopik analizlerin PCA analizine benzer olarak modelin PC kümülatif varyansları oldukça düşüktür. PC1'in toplam varyansı %12.52'iken, PC2'nin toplam varyans değeri %1.68'dir.



Şekil 4.19. LIBS verilerine ait PCA skor grafiği

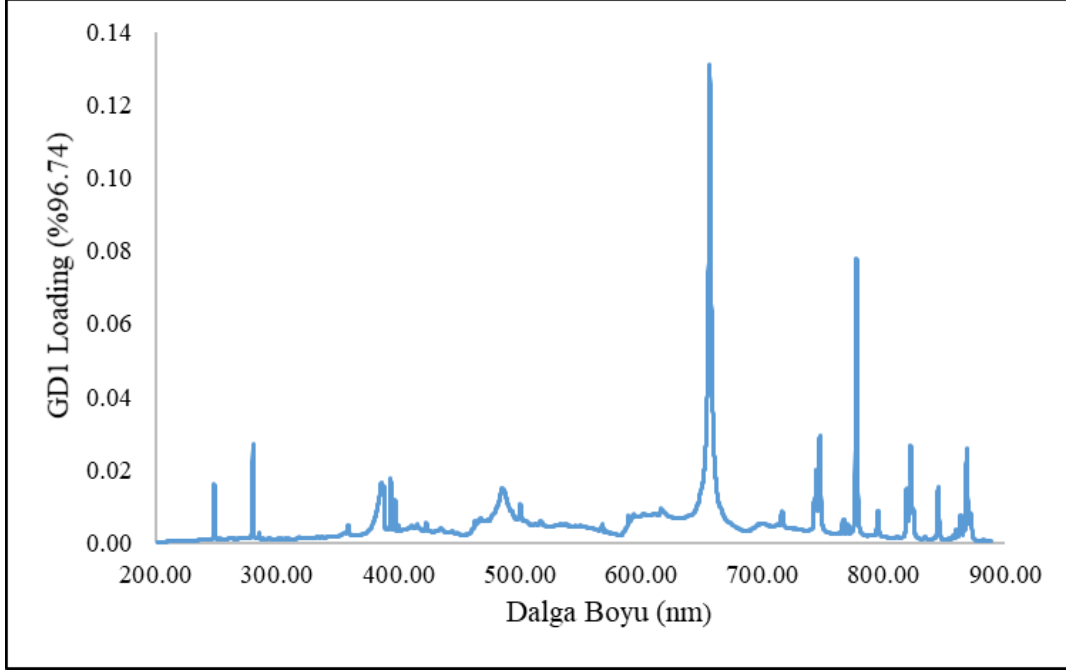
PCA modelinin sınırlı ayırım kabiliyeti göz önüne alındığında, LIBS verileri için doğru bir ayırma modeli elde etmek için PLS-DA kullanılmıştır. Ekmeklik ve makarnalık buğday unu örneklerinin LIBS verileri, PLS-DA kullanılarak kesinlikle birbirinden ayrılmıştır. En iyi model, normalleştirme+ düzgünleştirme ön işleme tekniklerinin kombinasyonu ile oluşturulmuştur.

Çizelge 4.9’da verilen modelin kantitatif parametreleri, RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.206, 0.185 ve 0.189 ile Hotelling’s T^2 değeri 99.90 bulunmuştur. Çapraz validasyon ile kalibrasyon duyarlılığı ve özgüllüğü 0.990 ve 1.000’ken, tahmin grubunun duyarlılığı ve özgüllük değerleri ise 1.000’dir. Genel olarak, buğday ununun sınıflandırılması ve ayrımının sağlanması örneklerinin ayırt edilmesinin oldukça başarılı olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.9. LIBS verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

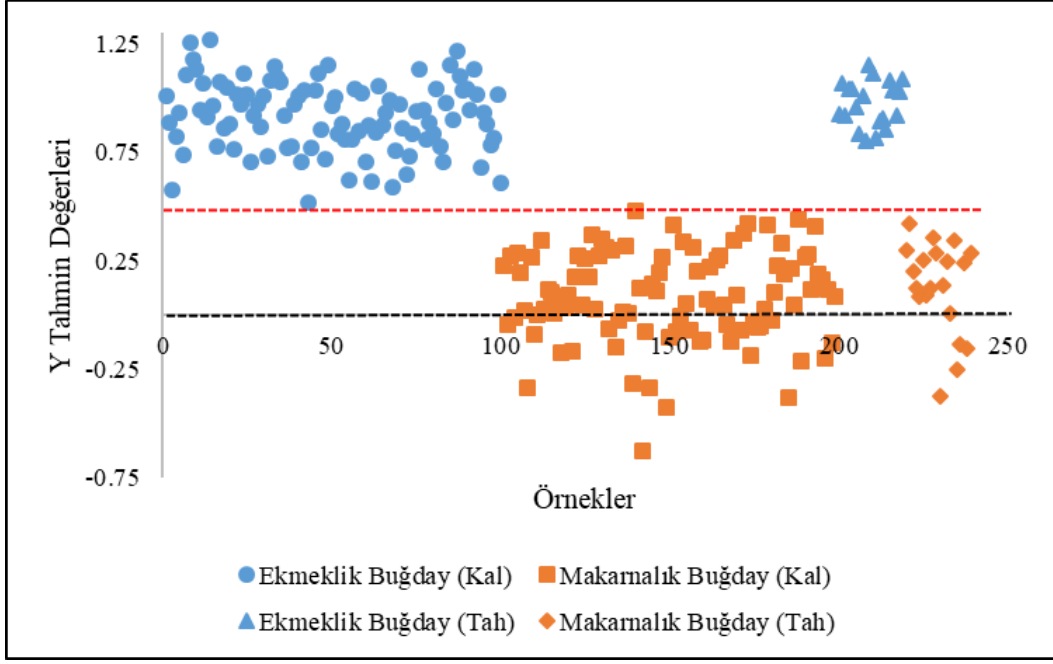
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	3	97.91	0.990	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.220	0.224	0.222	99.26	0.74
AS	5	54.16	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.180	0.202	0.192	92.43	7.57
BLC	3	97.62	0.980	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.222	0.227	0.225	99.11	0.89
DERIV	4	93.54	0.990	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.220	0.224	0.229	99.78	0.22
DET	3	97.33	0.970	1.000	0.970	1.000	1.000	1.000	0.222	0.227	0.232	99.10	0.90
MC	3	48.29	0.970	1.000	0.970	1.000	1.000	1.000	0.220	0.224	0.220	86.61	13.39
NORM	6	94.72	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.184	0.200	0.181	99.89	0.11
SMO	3	99.05	0.970	0.980	0.970	0.990	1.000	1.000	0.221	0.223	0.249	99.87	0.13
NORM-SMO	4	96.74	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.206	0.211	0.189	99.90	0.10
NORM-DET	6	94.73	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.185	0.198	0.185	99.87	0.13

Modelin loading değer grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir. LIBS spektumuna benzeyen ön işlem seğilmiştir.



Şekil 4.20. LIBS verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

Şekil 4.21’deki skor grafiğinde de görüldüğü üzere LIBS verilerinden geliştirilen model, ekmeklik ve makarnalık buğday unu örnekleri arasında iyi bir ayırım kapasitesine sahiptir. Modelin tahmin matrisi incelendiğinde kalibrasyon grubundaki ekmeklik buğday ununun bir tanesinin ve çapraz validasyon grubundaki ekmeklik buğday ununun bir tanesinin yanlış bir Şekilde makarnalık olarak sınıflandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. LIBS verilerine ait PLS-DA skor grafiği

Tüm modellere ait DPO, DNO, YPO ve YNO Çizelge 4.10'da verilmiştir. Buğdayın sınıflandırılması ve hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi, gıda tağşişinin önlenmesi için gereklidir. Bu nedenle, spektroskopik yöntemler avantajları nedeniyle klasik yöntemlerin yerini almaktadır. Spektroskopik yöntemler hızlı, güvenilir, kullanıcı ve çevre dostu yeşil yöntemlerdir. Bu yöntemler, buğdayların sınıflandırılması ve ayrımı için klasik yöntemlere bir alternatif olabilir. Bu amaçla, bu çalışmada PCA ve PLS-DA ile kombine edilmiş farklı spektroskopik yöntemler kullanılmıştır. Buğday unu sınıflandırması için en iyi yöntemin %100 ayırım oranına sahip olan SFS olduğu tespit edilmiştir. ATR-FTIR ve NIR spektroskopileri, buğday unu ayrımı için benzer sonuçlar sağlamıştır. Bu iki spektroskopik teknik için çapraz validasyon değerleri 0.990'dır. LIBS'in buğdayların sınıflandırılma performansı, NIRS ve ATR-FTIRS'dan sonra gelmektedir. RS'nin kötü performansı floresanstan kaynaklanan interferanstır. Bu nedenle diğer spektroskopik yöntemlere göre buğday sınıflandırılmasında daha sınırlı kullanım poansiyeline sahiptir. Raman spektroskopisi, 20 ekmeklik buğday unu örneğinden 13'ünü makarnalık buğday olarak sınıflandırmıştır. SFS tekniğinin, buğdayların ayrımı için rutin analizlerde kullanılabilecek kolay ve hızlı bir metot olduğu bulunmuştur. Hata matrisinde de görüldüğü üzere en iyi sınıflandırma SFS'yle elde edilmişken, en kötü sınıflandırma RS'dan elde edilmiştir.

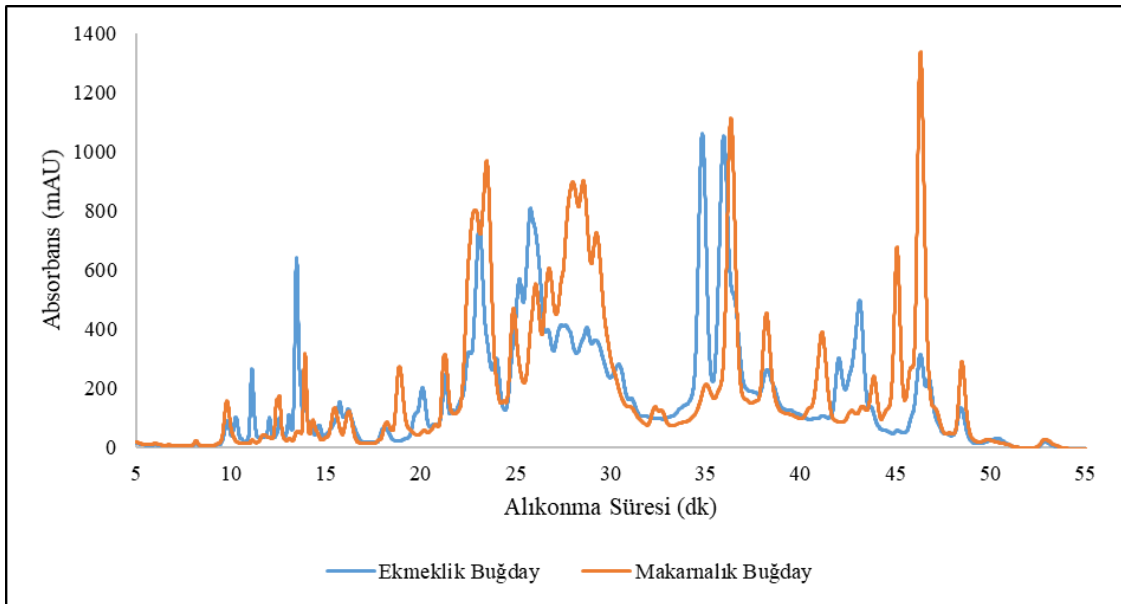
Çizelge 4.10. PLS-DA modellerine ait hata matrisi

		DPO			YPO			DNO			YNO		
		Kal	CV	Tah	Kal	CV	Tah	Kal	CV	Tah	Kal	CV	Tah
NIRS	Ekmeklik	1.000	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.010	0.000
	Makarnalık	1.000	1.000	1.000	0.000	0.010	0.000	1.000	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000
ATR-FTIRS	Ekmeklik	1.000	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.010	0.000
	Makarnalık	1.000	1.000	1.000	0.000	0.010	0.000	1.000	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000
SFS	Ekmeklik	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	Makarnalık	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
RS	Ekmeklik	0.990	0.960	0.350	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.040	0.650
	Makarnalık	1.000	1.000	1.000	0.010	0.040	0.650	0.990	0.960	0.350	0.000	0.000	0.000
LIBS	Ekmeklik	0.990	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.010	0.010	0.000
	Makarnalık	1.000	1.000	1.000	0.010	0.010	0.000	0.990	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000

4.2.6. Ters Farz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

İlgili literatürde tağşişin tespit edilmesi amacıyla kromatografik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında spektroskopik yöntemlerin sonuçları ile karşılaştırmak amacıyla RP-HPLC de kullanılmıştır.

Şekil 4.22’de gösterildiği gibi, ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının kromatogramlarında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Ekmeklik buğday unları için ω -gliadinler (5-25 dakika) daha yoğunken; makarnalık buğday unu örneklerinin pikleri α/β -gliadinler (25-40 dakika) ve γ -gliadinler (40-55 dakika) bölgelerinde daha yoğundur.



Şekil 4.22. Ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ortalama kromatogramları

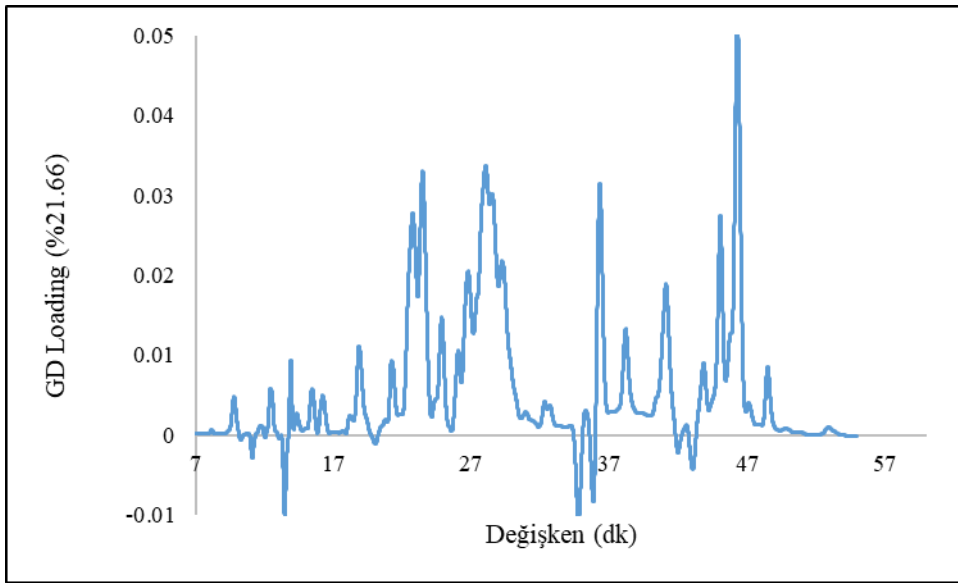
Ekmeklik buğday ununun en önemli pikleri 11, 13.4, 16.5, 23, 25-26, 27.5, 35.7, 35.8, 35.4, 43.2, 46.7 dakikalarda oluşmuştur. Makarnalık buğday unlarında ise en önemli pikler 12.5, 14, 15.5, 19, 22.7, 23.5, 28, 32.7, 36.5, 38.5, 45, 46.5, 48.8 dakika ortaya çıkmıştır. Literatürde makarnalık buğday için dominat pikler 47, 65, 68 ve 69. dakikalarda olduğu gözlemlenirken ekmeklik buğdayların kromatogramların da 27. dk da tekli, 43 ve 44.dk da ikili ve üçlü, 55 ve 57. dakikada ikili piklerin olduğu görülmüştür (Wieser ve ark., 1983; Wieser, 1996; Wieser, 2007).

Ekmeklik ve makarnalık buğday sınıflandırılmasında ön işlemsiz ve 9 tane ön işlem kullanılmış ve performans parametreleri Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA modellerinin performans parametreleri

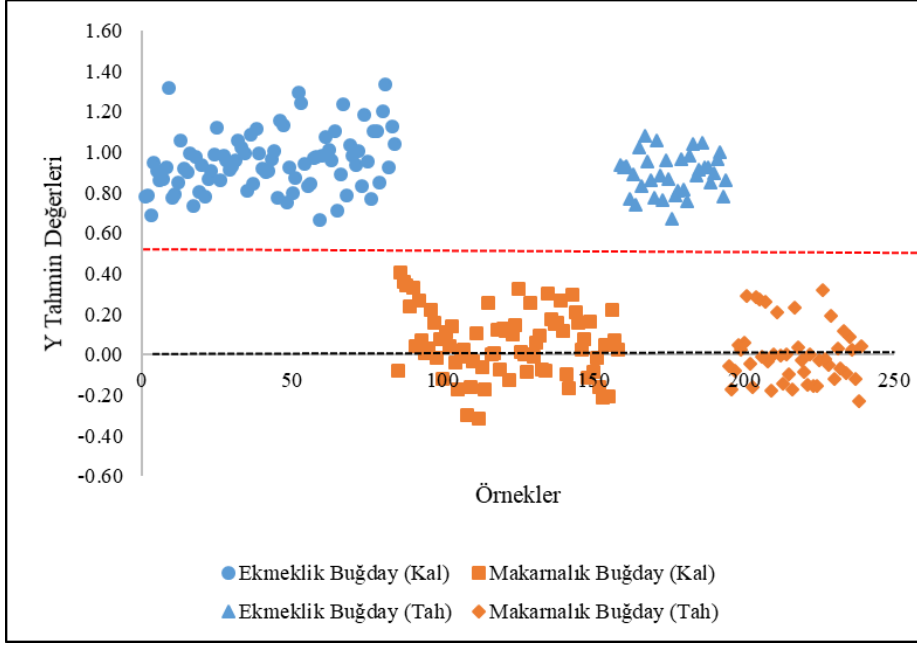
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)
Ön işlemsiz	3	21.48	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.160	0.175	0.144	81.80	18.20
AS	2	24.13	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	0.151	0.164	0.135	31.64	68.36
BLC	3	14.91	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.160	0.174	0.143	77.30	22.70
DERIV	7	13.01	1.000	1.000	0.976	0.946	0.946	0.976	0.116	0.204	0.132	55.14	44.86
DET	3	19.98	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.159	0.174	0.143	73.01	26.99
MC	2	27.98	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.168	0.183	0.139	36.38	63.62
NORM	3	10.55	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.109	0.122	0.077	81.10	18.90
SMO	3	21.66	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.160	0.174	0.144	82.13	17.87
NORM-SMO	3	10.57	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.109	0.121	0.077	81.44	18.56
NORM-DET	3	15.13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.108	0.120	0.076	72.12	27.88

Tüm modellerde % GD1 değeri düşük çıkmıştır. En düşük RMSEP değerinin (0.076) normalleştirme+yönsemeyi giderme kombinasyonuna sahip olan modelde olduğu bulunmuştur ancak modelin %GD1 ile Hotelling's T^2 değerleri iyi performansa sahip değildir. En yüksek %GD1 değerine sahip ortalama merkez ön işleminde ise çok düşük Hotelling's T^2 değeri vardır. En yüksek Hotelling's T^2 değeri ve makul GD1(%) değeri olan ön işlemin seçilmesi amacıyla düzgünleştirme ön işlemi seçilmiştir. Ayrıca, düzgünleştirme ön işlemi örneklerin kromatogramlarına en çok benzeyen loadinge sahip olduğu görülmüştür. Modelin loading grafiği Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA modeli loadings değerleri

Düzgünleştirme modelinin kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin gruplarının duyarlılığı ve özgüllük değerlerinin 1.000 olduğu bulunmuştur. Modelin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.160, 0.174 ve 0.144 şeklindedir. Veriler Çizelge 4.11'de verilmiştir. Ekmeklik buğday unu kalibrasyon ve tahmin verileri eşik çizgisinin üstünde konumlanırken, makarnalık veriler eşik değerinin altında kümeleşmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğday unu başarılı bir şekilde ayrılmış ve sınıflandırılmıştır. Modelin skor grafiği Şekil 4.24'de verilmiştir. Modelin DPO ve DNO 1.000 iken; YPO ve YNO 0.000'dır. Tüm örnekler doğru şekilde sınıflandırılmıştır.



Şekil 4.24. RP-HPLC verilerine ait PLS-DA skor grafiği

Spektroskopik ve kromatografik verilerin karşılaştırıldığı performans parametreleri Çizelge 4.12’de verilmiştir. En düşük RMSEP değeri kromatografiden elde edilmiştir. Ancak RP-HPLC’nin Hotelling’s T^2 ve %GD1 değerleri dikkate alındığında spektroskopik yöntemlere göre daha düşük performans sergilemiştir. Saf çeşit buğdayların ayrıştırılmasında SFS’nin daha iyi performans sergilediği görülmektedir.

Çizelge 4.12. PLS-DA modellerinin performans parametreleri

	GD	GD1 (%)	Sen (Kal)	Spec (Kal)	Sen (CV)	Spec (CV)	Sen (Tah)	Spec (Tah)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Hotelling's T² (%)	Q-Residuals (%)
NIRS	10	98.52	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.158	0.175	0.174	100.00	0.00
ATR-FTIRS	4	99.70	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.186	0.190	0.146	99.98	0.02
SFS	5	99.63	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.164	0.171	0.194	100.00	0.00
RS	4	87.83	0.990	1.000	0.960	1.000	0.350	1.000	0.187	0.210	0.441	99.20	0.80
LIBS	4	96.74	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.206	0.211	0.189	99.90	0.10
RP-HPLC	3	21.66	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.160	0.174	0.144	82.13	17.87

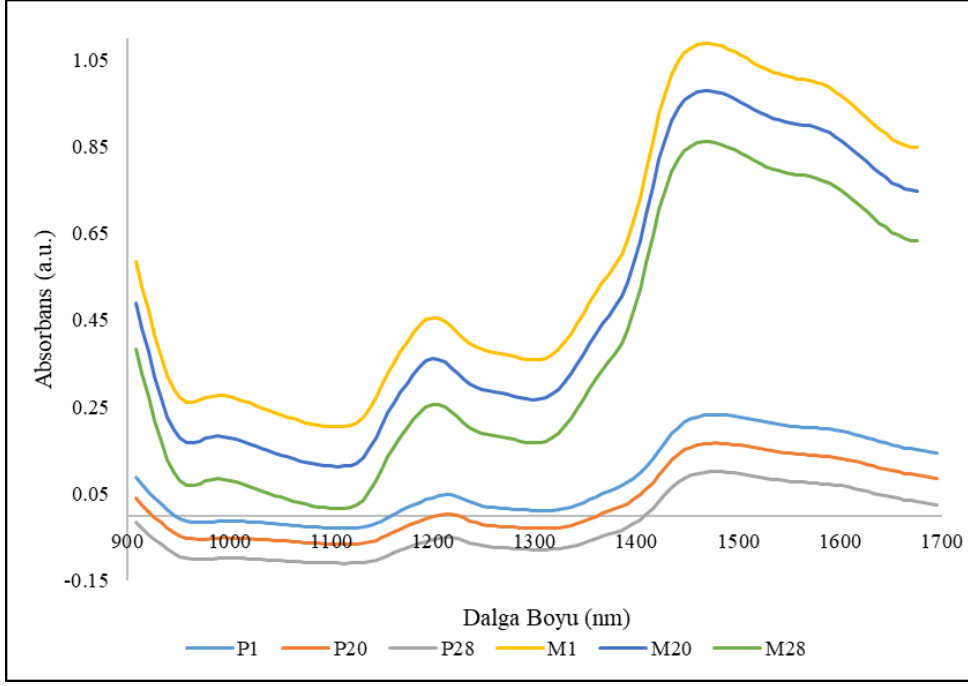
4.3. Paçal Un ve Makarna Örneklerinin Spektroskopik ve Kromatografik Analiz Sonuçları

Paçal unu örneklerinde (28 adet) NIRS, ATR-FTIRS, SFS, RS, LIBS ve RP-HPLC analizleri ile makarna (28 adet) örneklerinde NIRS, ATR-FTIRS, SFS ve RP-HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Teknik aksaklıklar sebebiyle makarnada LIBS ve RS analizleri gerçekleştirilememiştir.

4.3.1. Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

Örneklerden makarnalık buğday unu örneği (%0 ekmeklik buğday, P1), %50 ekmeklik ve makarnalık buğday unu karışımı örneği (P20), ekmeklik buğday unu örneği (%100 ekmeklik buğday, P28) ile makarnalık buğday kullanılarak üretilen makarna (%0 ekmeklik buğday, M1), %50 ekmeklik-makarnalık buğday karışımından üretilen makarna (M20) ile ekmeklik buğday kullanılarak üretilen makarna (%100 ekmeklik buğday, M28) örneklerinin NIR spektroskopisi kullanılarak elde edilen spektrumları Şekil 4.25’de verilmiştir.

Saf ekmeklik ve makarnalık buğday unlarında olduğu gibi makarnalık buğday unu (P1), %50 ekmeklik-makarnalık buğday unu karışımı (P20) ile ekmeklik buğday unu (P28) örnekleri arasında önemli bir fark görülmemiş bütün paçal unlarda da benzer spektrumlar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, örneklerin bantlarında yoğunluk farkı oluşmuştur. En yüksek ekmeklik buğday seviyesindeki (P28) örneğin bant yoğunluğu, saf durum buğday unu örneğinin (P1) bant yoğunluğuna göre daha düşüktür.



Şekil 4.25. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama NIR spektrumları

Paçal un örneklerinin NIR sonuçlarına benzer olarak makarnada da benzer spektrum sonuçları alınmıştır. Makarnalık buğday kullanılarak üretilen makarna (M1), %50 ekmeklik-makarnalık buğday karışımından üretilen makarna (M20) ile ekmeklik buğday kullanılarak üretilen makarna (M28) örnekleri arasında önemli bir fark görülmemiş bütün makarna örneklerinde benzer spektrumlar gözlemlenmiştir. Ancak en yüksek makarnalık buğday içeren makarnanın (M28) bant yoğunluğu, ekmeklik buğdaydan üretilen makarnanın (M1) bant yoğunluna göre daha yüksektir. Ayrıca makarna örneklerinin bant yoğunluğunun un örneklerine göre yüksek olduğu görülmüştür.

Ekmeklik, makarnalık ve karıştırılmış buğday unu ve makarna örneklerinin NIR spektrumu, önceki çalışmalara benzer bir şekilde 940-1050, 1150-1260 ve 1420-1540 nm'de bant aralıklarında gözlenmiştir. Literatürde bu bantların buğdayın lipid, karbonhidrat ve protein gibi fonksiyonel gruplarıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Rodríguez-Saona ve ark., 2017). NIR spektrumu, üst ton bölgesi ve kombinasyon bölgesi olarak iki bölgeye sahiptir. Nişasta, lipid ve protein ile ilişkili 920 ve 1200 nm'deki pikler CH gerilmesini temsil ederken, NH ve OH titreşimleri 1000 ve 1400

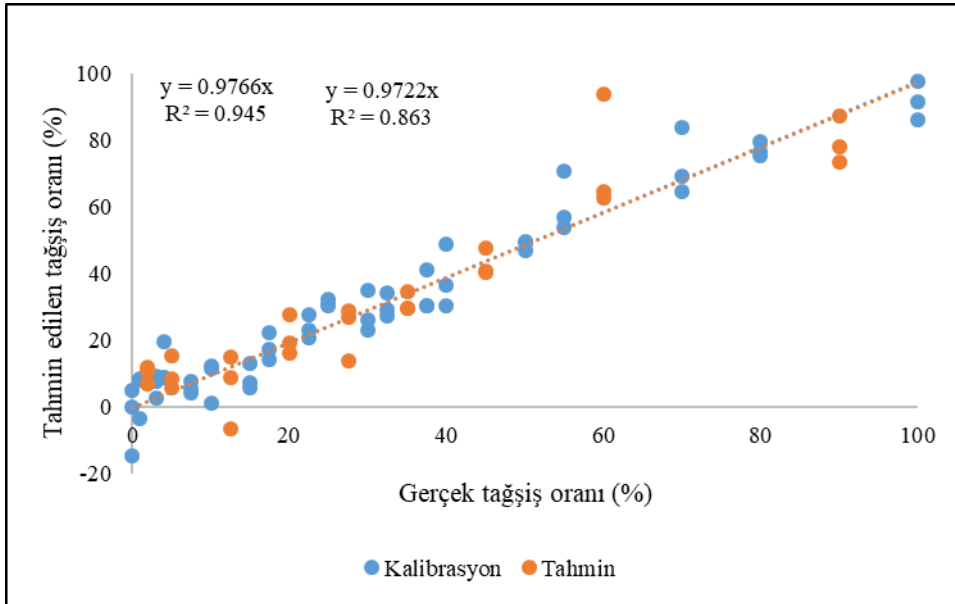
nm'de yansıtılmaktadır (Tønning, 2007; Zhao ve ark. 2013). 1200 nm'deki pik C-H hakkında bilgi verirken, 1450 nm'deki pik OH ile ilişkilidir (Osborne ve ark. 1993). 1370-1450 nm'deki piklerin OH bağları nedeniyle olduğu bulunmuştur (Shenk ve ark., 2001; Tønning, 2007; Jespersen ve Munck, 2009).

Paçal un örneklerinde karışım oranının tahmin edilmesi için en uygun model seçilmesi amacıyla ön işlemsiz, tekli ve ikili ön işlemler kullanılmıştır. NIR spektrum verilerinin, çeşitli ön işlemler ile gerçekleştirilen PLSR kemometrik veri analizi Çizelge 4.13'te gösterilmektedir. Normalleştirme ön işlemi kullanıldığında en düşük RMSEP değerinin 6.631 olduğu bulunmuştur ancak normalleştirme modelinin LOD (7.609) ve LOQ (23.038) değerleri çok yüksek çıkmıştır. Bu nedenle istatistiksel sonuçları en anlamlı olan model seçilmiştir. Taban çizgisi düzeltme ön işlemi kullanılan modelin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 6.642, 7.069 ve 9.940 olarak elde edilmiştir. Modelin LOD ve LOQ değerleri 0.784 ve 2.376 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.13. Paçal unların NIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön işlemsiz	5	96.33	6.293	7.655	7.611	100.00	0.00	3.698	12.478	37.812	0.949	0.949	0.931
AS	3	94.79	32.294	32.471	32.099	99.97	0.03	1.219	9.784	29.648	0.943	0.932	0.946
BSC	4	100.00	6.442	7.0689	9.940	100.00	0.00	0.232	0.784	2.376	0.946	0.935	0.867
DERIV	5	99.98	6.208	7.197	11.094	100.00	0.00	3.913	13.205	40.016	0.950	0.933	0.838
DET	4	99.99	7.939	9.535	11.701	100.00	0.00	0.767	2.627	7.960	0.918	0.883	0.818
MC	3	94.76	32.308	32.490	32.205	99.97	0.03	1.251	10.067	30.507	0.942	0.930	0.930
NORM	5	96.31	6.112	7.304	6.631	100.00	0.00	2.257	7.609	23.038	0.952	0.931	0.946
SMO	3	96.12	11.824	12.952	18.391	100.00	0.00	0.729	2.613	7.917	0.819	0.784	0.573
SNV	7	100.00	4.477	5.847	7.840	100.00	0.00	1.177	3.928	11.904	0.974	0.956	0.917
SNV-MSC	7	100.00	4.477	5.847	7.840	100.00	0.00	1.177	3.928	11.902	0.974	0.956	0.917
NORM-SMO	6	96.10	6.532	9.582	7.308	100.00	0.00	2.094	7.081	21.456	0.954	0.883	0.930
NORM-DET	6	99.99	5.304	7.058	8.828	100.00	0.00	0.318	1.067	3.234	0.964	0.937	0.903

Paçal unların kalibrasyon ve tahmin grafikleri Şekil 4.26'da verilmiştir. Modelin kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0.945 bulunmuştur. Ancak, tahmin eğrisinin R^2 değeri çok yüksek olmayıp 0.863'tür. Diğer spektroskopik analiz metotları ile karşılaştırıldığında NIR'in LOD ve LOQ değerleri Raman ve SFS'den daha düşüktür. Buna göre, gıda endüstrisinde nem ve protein gibi kalite parametrelerinin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılan NIR spektroskopisi makarnalık buğday unundaki ekmeklik buğday ununun tespitinde de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. NIR'in fabrikalarda rutin olarak kullanılması buğday unundaki tağşişin tespitinde büyük bir avantaj oluşturabilir.



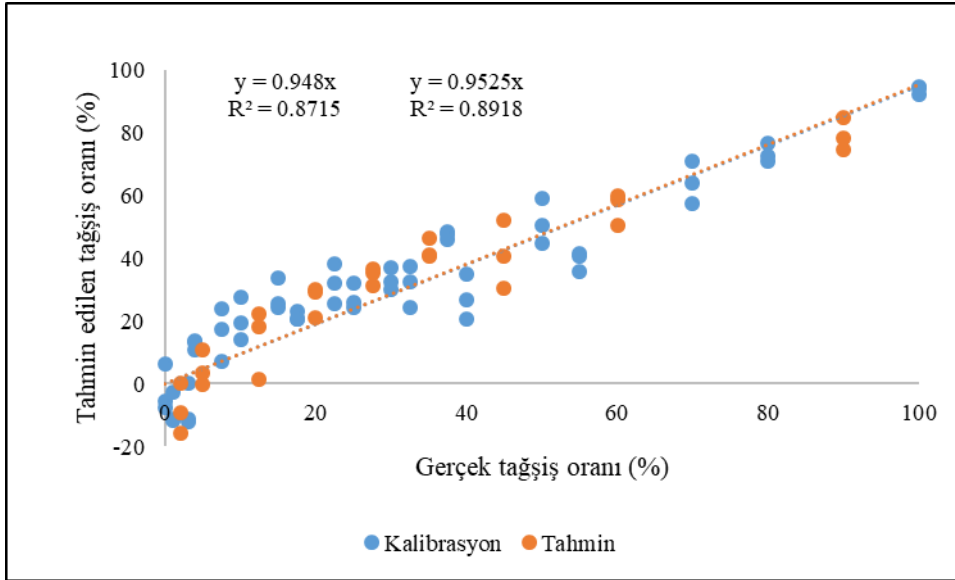
Şekil 4.26. Paçal unlarının NIRS verilerine ait PLSR modeli

Makarna örneklerinde ekmeklik buğdaydan üretilen farina ilave oranının tahmin edilmesi için en uygun model seçimi Çizelge 4.14'teki performans parametrelerine göre gerçekleştirilmiştir. En düşük RMSEP değeri (8.727) ile en yüksek tahmin R^2 değerinin (0.899) normalleştirme ve düzgünleştirme ön işlemleri kombine edilerek gerçekleştirilen ön işlemde elde edilmesine rağmen bu modelin LOD (7.828) ve LOQ (23.722) değerleri oldukça yüksektir. Bu nedenle ikinci en yüksek tahmin R^2 (0.895) ve en düşük RMSEP (8.747) değerlerine sahip model olan standart normal değişken model seçilmiştir. Bu model diğer modellere göre daha anlamlı LOD ve LOQ değerler vermiştir. Modelin LOD ve LOQ değerleri 1.079 ve 3.270'tir.

Çizelge 4.14. Makarna örneklerinin NIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 %	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q- Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	6	99.99	10.098	13.663	11.265	100.00	0.00	3.727	13.058	39.570	0.868	0.758	0.836
AS	5	89.76	33.417	34.757	33.893	99.92	0.08	4.445	39.650	120.150	0.847	0.714	0.800
BSC	5	100.00	10.640	13.491	10.114	100.00	0.00	5.057	17.828	53.966	0.853	0.764	0.862
DERIV	5	99.99	12.751	14.650	12.638	100.00	0.00	5.656	20.555	62.287	0.789	0.724	0.813
DET	5	100.00	10.206	13.540	9.265	100.00	0.00	0.610	2.138	6.480	0.864	0.762	0.881
MC	6	93.42	32.813	34.784	30.947	99.96	0.04	2.101	17.686	53.594	0.899	0.752	0.846
NORM	6	99.99	9.710	13.165	10.74	100.00	0.00	2.908	10.133	30.706	0.878	0.775	0.850
SMO	7	99.99	10.834	12.885	9.087	100.00	0.00	1.783	6.299	19.088	0.848	0.786	0.890
SNV	5	100.00	9.595	12.926	8.747	100.00	0.00	0.310	1.079	3.270	0.881	0.783	0.895
SNV-MSC	5	100.00	9.595	12.926	8.750	100.00	0.00	0.310	1.079	3.270	0.881	0.784	0.895
NORM- SMO	7	99.99	10.586	12.570	8.727	100.00	0.00	2.223	7.828	23.722	0.855	0.797	0.899
NORM-DET	5	100.00	9.853	13.024	9.047	100.00	0.00	0.892	2.862	8.73	0.874	0.780	0.887

Makarna örneklerinin kalibrasyon ve tahmin grafikleri Şekil 4.27’de verilmiştir. Modelin kalibrasyon ve tahmin grafiği incelendiğinde %5’in üstündeki farına oranının tespitinde oldukça iyi olduğu görülmektedir. NIR’in düşük seviyedeki tağış oranının tespitinde, paçal un örneklerindeki ekmeklik unun tespitinde makarnadaki farınanın tespitine göre daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Ekonomik kazanım amacıyla makarnadaki tağış seviyesi %5’den daha daha yüksek seviyelerde uygulanmaktadır. Bu nedenle pratik uygulamalarda %5’in üstündeki değerler tatmin edici olarak kabul edilebilir. Ayrıca NIR tekniğinin paçal unlardaki performansının daha iyi olması nedeniyle hammaddeki tağış tespitinde daha başarılı olduğu söylenebilir. Böylece tağış hammaddede, makarna üretilmeden önce tespit edilmiş olacaktır.

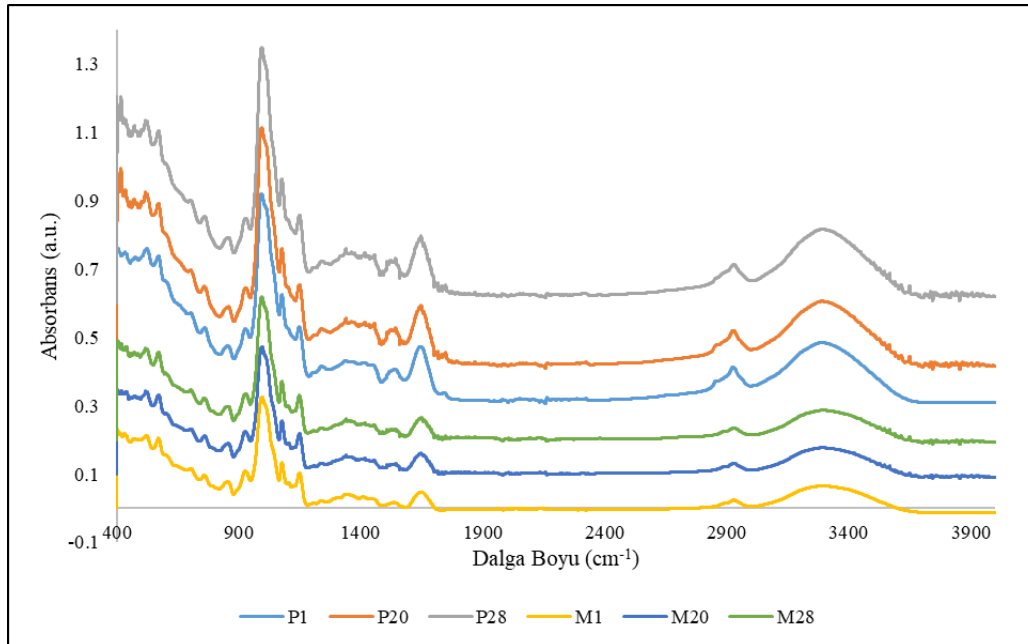


Şekil 4.27. Makarna örneklerinin NIRS verilerine ait PLSR modeli

Diğer spektroskopik analiz metotları ile karşılaştırıldığında ise paçal undaki sonuçlara göre NIR'in LOD ve LOQ değerleri Raman ve SFS'den daha düşüktür. Buna göre, gıda endüstrisinde nem ve protein gibi kalite parametrelerinin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılan NIR spektroskopisinin makarnalık buğday unundaki ekmeklik buğday ununun tespitinde de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. NIR'in fabrikalarda rutin olarak kullanılması buğday unundaki tağışın tespitinde büyük bir avantaj oluşturabilir.

4.3.2. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak makarnalık buğday unu örneği (%0 ekmeklik buğday, P1), %50 ekmeklik ve makarnalık buğday unu karışımı örneği (P20), ekmeklik buğday unu örneği (%100 ekmeklik buğday, P28) ile makarnalık buğday kullanılarak üretilen makarna (%0 ekmeklik buğday, M1), %50 ekmeklik-makarnalık buğday karışımından üretilen makarna (M20) ile ekmeklik buğday kullanılarak üretilen makarnadan (%100 ekmeklik buğday, M28) elde edilen spektrumlar Şekil 4.28’de verilmiştir. Saf ekmeklik ve makarnalık buğday unlarında olduğu gibi makarnalık buğday unu (P1), %50 ekmeklik-makarnalık buğday unu karışımı (P20) ile ekmeklik buğday unu (P28) arasında önemli bir fark görülmemiş bütün paçal unlarda da benzer spektrumlar gözlemlenmiştir. Aynı şekilde makarna örneklerinin spektrumlarının birbirine çok benzer çıktığı görülmüştür. En yüksek ekmeklik buğday seviyesindeki (P28) örneğin bant yoğunluğu, durum buğday unu örneğinin (P1) bant yoğunluğuna göre daha yüksektir. Makarna örneklerinde de farinadan üretilen makarnanın bant yoğunluğu daha yüksektir. Ana pikler 760, 845, 950-1150, 1380, 1550-1656, 2930-3320 cm^{-1} ’de elde edilmiştir.



Şekil 4.28. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama ATR-FTIR spektrumları

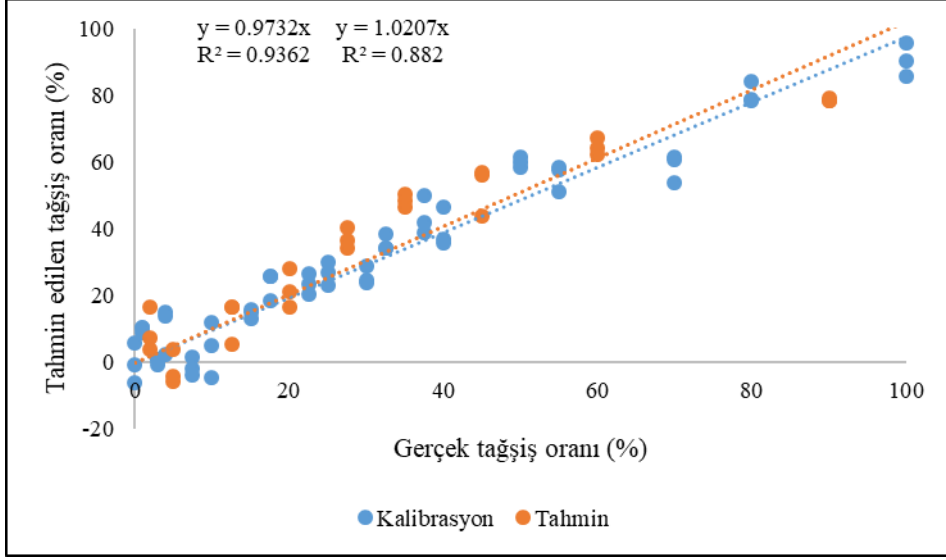
Önceki çalışmalarda ATR-FTIR piklerinin O-H, C-H, amid I ve amid II ile ilişkili olduğu bulunmuştur. 897, 995 ve 1158 cm^{-1} 'deki pikler C-O-C'nin karakteristiği iken, 930 cm^{-1} 'deki pik noktası C-O gerilmesini göstermektedir. 1035-1047 cm^{-1} 'deki pik C-OH varlığında gözlenmektedir. 1457 cm^{-1} 'deki pik CH bükülmesi ile ilişkilendirilmektedir. 1540 ve 1650 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla amid II (C-N ve N-H bağları) ve amid I (C = O germe) ile ilişkilidir. 1745, 2850, 2926 ve 3050 cm^{-1} 'deki pikler, lipitlere bağlı olarak CH germe ile ilgilidir. 3393-3427 cm^{-1} 'deki pik ise N-H nedeni ile oluşmaktadır (Cocchi ve ark., 2004; Barron ve Rousu, 2008; Kamil ve ark., 2011). Sert buğdayın FTIR spektrumu incelendiğinde COO nedeniyle 1420 cm^{-1} ve C-OH nedeniyle 1375 cm^{-1} 'de spesifik piklerin görüldüğü, durum buğday örneğinde ise 1745 ve 2857 cm^{-1} 'de pikler tespit edilmiştir (Kamil et al., 2011).

Ön işlem modelleri, ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır ve elde edilen performans parametreleri Çizelge 4.15'de gösterilmiştir. Ancak ön işlem kullanılan modellerin veri analizinde anlamlı performans parametreleri elde edilememiştir. Örneğin taban çizgisi düzeltilmesi ön işlemi en düşük RMSEP (8.738) değerine sahipken LOD ve LOQ değerlerinin yüksek (3.188 ve 9.662) olduğu tespit edilmiştir. Diğer ön işlemlerle kıyaslandığında ön işlemsiz modelin, tağşişin saptamasında tatmin edici olduğu görülmüştür. Kullanılan tüm spektroskopik yöntemlerde unlardaki tağşiş tespitinde ATR-FTIRS en düşük ikinci LOD (%0.680) ve LOQ (%2.062) değerlerine sahiptir.

Çizelge 4.15. Paçal unların ATR-FTIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 %	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q- Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	5	99.93	6.883	8.602	8.980	100.00	0.00	0.201	0.680	2.062	0.939	0.904	0.900
AS	4	77.36	32.406	32.658	29.6771	98.14	1.86	0.155	1.259	3.816	0.934	0.911	0.899
BSC	4	99.80	6.886	8.223	8.738	99.99	0.01	0.940	3.188	9.662	0.939	0.912	0.906
DERIV	3	99.58	10.837	12.1055	13.049	99.89	0.11	0.067	0.236	0.714	0.848	0.810	0.765
DET	4	99.86	6.961	8.242	9.036	99.99	0.01	0.920	3.119	9.451	0.937	0.912	0.898
MC	3	89.11	32.913	33.124	32.371	98.15	1.85	1.251	10.638	32.237	0.891	0.864	0.882
NORM	5	99.93	7.528	9.430	9.977	100.00	0.00	0.413	1.475	4.262	0.927	0.885	0.877
SMO	5	99.94	7.178	8.727	9.068	100.00	0.00	0.448	1.522	5.021	0.933	0.902	0.900
SNV	4	99.90	7.807	9.299	9.880	99.99	0.01	0.656	2.242	6.793	0.921	0.888	0.881
SNV-MSC	4	99.90	7.804	9.296	9.878	99.99	0.01	0.656	2.241	6.792	0.921	0.888	0.881
NORM- SMO	5	99.94	7.824	9.537	10.109	100.00	0.00	0.801	2.740	8.304	0.921	0.882	0.877
NORM-DET	4	99.86	7.632	9.048	9.966	99.99	0.01	0.508	1.733	5.252	0.924	0.894	0.877

Ön işlemsiz ATR-FTIR'ın PLSR sonucu Şekil 4.29'da verilmiştir. Ön işlemsiz RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri 6.6883, 8.602 ve 8.980'dir. Kalibrasyon ve tahmin eğrilerinin R^2 değerleri 0.939 ve 0.882'dir. Buna göre, ATR-FTIR'ın, buğday unu karışımında ilave edilen ekmeklik buğday unu miktarını saptamada başarılı bir yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.



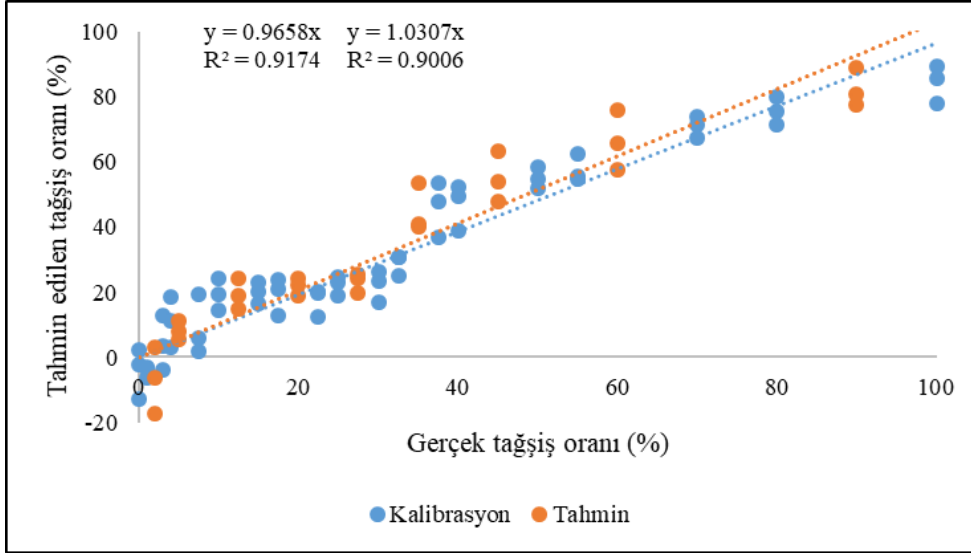
Şekil 4.29. Paçal unlarının ATR-FTIRS verilerine ait PLSR modeli

Makarna örneklerinde farina ilave oranının tahmin edilmesi için en uygun model seçimi Çizelge 4.16'daki performans parametrelerine göre gerçekleştirilmiştir. En düşük RMSEC (6.010), RMSECV (8.373) ve RMSEP (7.249) değerleri düzgünleştirme ön işleminde elde edilirken en yüksek tahmin R^2 değeri (0.937) otomatik ölçeklendirmede görülmüştür. En yüksek kalibrasyon R^2 değerleri 0.948 ile SNV ve SNV+MSC de bulunmuştur. Ancak bu ön işlemlerin LOD ve LOQ değerleri yüksektir. Bu nedenle anlamlı istatistiksel performans parametrelerine sahip ön işlemsiz model olan ATR-FTIR modeli verileri işlemede seçilmiştir. Modelin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 7.781, 9.417 ve 8.908 iken, LOD ve LOQ değerleri ise 0.494 ve 1.496'tır. Makarna ve paçal un örneklerinin ATR-FTIR sonuçlarında da ön işlemsiz model seçilmiştir.

Çizelge 4.16. Makarna örneklerinin ATR-FTIRS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 %	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q- Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	5	99.80	7.781	9.417	8.908	99.98	0.02	0.137	0.494	1.496	0.922	0.885	0.903
AS	5	68.96	32.270	32.669	31.612	99.27	0.73	0.227	1.816	5.503	0.945	0.925	0.937
BSC	4	99.88	8.675	10.597	9.475	99.98	0.02	1.903	6.554	19.860	0.902	0.855	0.881
DERIV	3	99.62	9.380	10.725	10.966	99.81	0.19	1.271	4.637	14.052	0.886	0.852	0.845
DET	4	99.88	8.993	10.638	10.350	99.96	0.04	1.069	3.697	11.202	0.895	0.853	0.860
MC	4	88.48	32.613	33.228	31.212	99.06	0.94	0.084	0.695	2.107	0.916	0.886	0.894
NORM	7	99.77	7.076	10.148	8.783	99.99	0.01	4.871	16.554	50.165	0.935	0.867	0.905
SMO	7	99.80	6.010	8.373	7.249	99.99	0.01	2.780	9.426	28.565	0.953	0.909	0.930
SNV	7	99.91	6.348	10.151	7.896	99.99	0.01	3.023	10.210	30.941	0.948	0.867	0.928
SNV-MSC	7	99.91	6.348	10.154	7.903	99.99	0.01	3.019	10.197	30.901	0.948	0.867	0.928
NORM- SMO	7	99.77	7.447	10.442	8.457	99.99	0.01	2.891	9.846	29.836	0.928	0.859	0.912
NORM-DET	4	99.87	10.664	12.450	11.193	99.96	0.04	2.270	8.005	24.257	0.852	0.780	0.833

Makarna örneklerinde ATR-FTIR ile elde edilen verilerde ön işlemsiz PLSR sonucu Şekil 4.30'da verilmiştir. Ön işlemsiz kalibrasyon ve tahmin eğrilerinin R^2 değerleri 0.917 ve 0.901'dir.



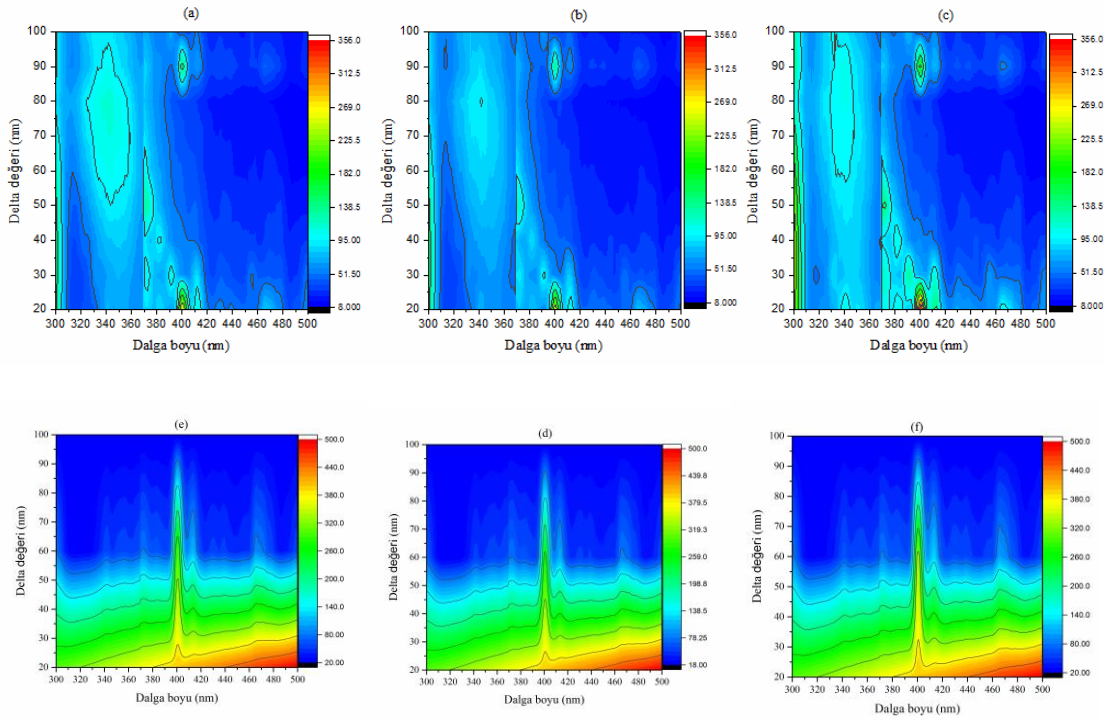
Şekil 4.30. Makarna örneklerinin ATR-FTIRS verilerine ait PLSR modeli

ATR-FTIR'ın paçal un ve makarna örneklerindeki tağış tespiti performansının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Paçal unların analizinden elde edilen RMSEP değeri 8.980 iken, makarna analizinden elde edilen RMSEP değeri ise 8.908'dir. Makarna örneklerinin LOD ve LOQ değeri ise paçal unların LOD ve LOQ değerlerine göre daha iyidir. Avrupa Birliği, öngörülemeyen nedenlerden ötürü makarnanın ekmeklik buğday ile %3'e kadar kontamine olmasına izin vermektedir (EU, 1994). Ekonomik kaygılar nedeniyle piyasada tağış oranı zaten %5'in üzerindedir. Buna göre, ATR-FTIR'ın, buğday unu karışımında ilave edilen ekmeklik buğday unu miktarını ve makarnadaki farınayı saptamada başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer spektroskopik analiz metotları ile karşılaştırıldığında ise paçal undaki ve makarnadaki sonuçlara göre ATR-FTIR'ın LOD ve LOQ değerleri RS, NIR, RP-HPLC ve SFS'den daha düşüktür.

4.3.3. Senkronize Floresans Spektroskopisi

Şekil 4.31’de makarnalık buğday unu örneğinin (a, P1), %50 ekmeçlik ve makarnalık buğday unu karışımı örneğinin (b, P20) ve ekmeçlik buğday unu örneğinin (c, P28) ile makarnalık buğday kullanılarak üretilen makarna (d, M1), %50 ekmeçlik-makarnalık buğday karışımından üretilen makarna (e, M20) ile ekmeçlik buğday kullanılarak üretilen makarnadan (f, M28) elde edilen spektrumları gösterilmektedir..



Şekil 4.31. Paçal unların ve makarna örneklerinin ortalama SFS spektrumları

Hububatın kimyasal bileşimine göre absorpsiyon ve emisyon oranı değişmektedir. Yüksek nişasta ve düşük protein içeriği iyi bir ışık yayılmasına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, tahıllarda 290-600 nm arasında üç adet emisyon bandı görülürken 280, 330, 400 ve 450 nm’de dört absorpsiyon bandı tespit edilmiştir. 280 ve 335 nm’deki absorpsiyon ve emisyon bandı, aromatik amino asitlerin varlığında oluşmaktadır (Zandomeneghi, 1999). 270-310 nm’deki uyarılma ile 310-390 nm’deki emisyondaki güçlü bantlar, triptofana atfedilmektedir (Ahmad ve ark., 2016). Ayrıca triptofana bağlı olarak ekmeçlik buğday unu, sert buğday irmiği ve makarnanın floresans spektrumlarında sırasıyla 335, 338 ve 334 nm’de bantlar gözlenmektedir

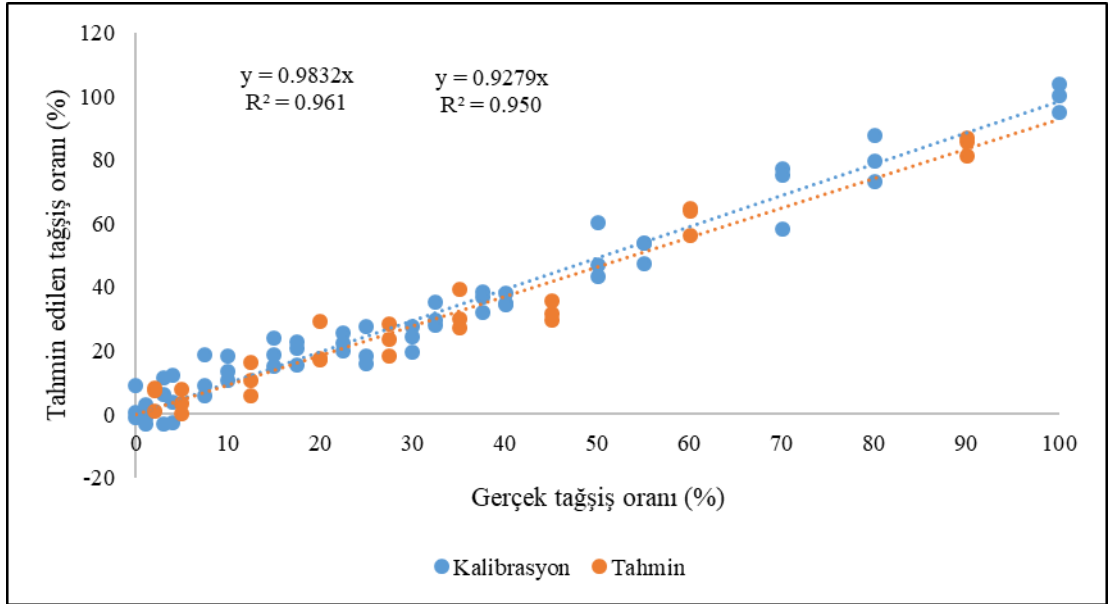
(Karoui, Cartaud ve Dufour, 2006). Maksimum uyarma ve emisyonundaki 330 ve 430 nm'deki bantlar tokoferoller ve 4-aminobenzoik asitlerle karakterize edilmektedir. 345 nm'deki bant gluten içeriğiyle ilişkili iken, 445 nm'deki bant karotenoid konsantrasyonu olarak lutein ve ksantofillere bağlantılıdır (Zandomenighi, 1999).

Ön işlem modelleri, ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır ve elde edilen veriler Çizelge 4.17'de gösterilmiştir. Ancak çizelgede de görüldüğü üzere modellerin veri analizinde elde edilen performans parametreleri anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.17. Paçal unların SFS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön işlemsiz	2	99.90	8.290	8.435	8.487	99.98	0.02	1.491	5.119	15.511	0.911	0.908	0.915
AS	2	96.13	32.064	32.065	33.034	98.71	1.29	3.286	25.882	78.429	0.962	0.959	0.950
BSC	4	99.90	4.504	6.935	7.388	99.97	0.03	1.816	6.059	18.361	0.974	0.378	0.930
DERIV	4	99.91	5.461	7.094	6.497	99.98	0.02	1.611	5.409	16.391	0.961	0.935	0.950
DET	3	99.86	5.038	7.495	7.457	99.96	0.04	1.652	5.530	16.758	0.967	0.928	0.930
MC	2	97.19	32.043	32.064	33.858	98.91	1.09	1.552	12.201	36.973	0.964	0.959	0.961
NORM	2	99.92	6.610	6.770	6.387	99.98	0.02	1.951	6.604	20.011	0.943	0.941	0.953
SMO	2	99.91	8.333	8.447	8.534	100.00	0.00	1.535	5.374	16.284	0.911	0.908	0.913
SNV	2	99.74	6.663	6.815	6.382	99.95	0.05	1.982	6.710	20.330	0.942	0.940	0.953
SNV+MSC	2	99.74	6.824	6.824	6.406	99.95	0.05	1.9744	6.683	20.251	0.942	0.940	0.953
NORM-SMO	2	99.93	6.644	6.765	6.444	100.00	0.00	2.043	6.917	20.960	0.943	0.941	0.952
NORM-DET	2	99.88	6.698	6.939	7.136	99.95	0.05	2.207	7.470	22.637	0.942	0.938	0.945

Genel itibariyle tüm modellerde LOD ve LOQ değerleri çok yüksek çıkmıştır. Bu noktada yüksek tahmin R^2 değeri ile düşük RMSEP ve LOD/LOQ değerleri dikkate alınarak türevlendirme ön işlemi kullanılmıştır. Paçal unların SFS verilerine ait PLSR modeli Şekil 4.32’de verilmiştir. Modelin istatistiksel değerlendirme sonuçları RMSEC, RMSECV ve RMSEP olarak 5.461, 7.094 ve 6.497 olarak elde edilmiştir. Kalibrasyon ve tahmin R^2 değerleri (0.961 ve 0.950) iyi olmasına rağmen, LOD ve LOQ değerlerinin yüksek olduğu (5.409 ve 16.391) bulunmuştur. Diğer spektroskopik yöntemlerle karşılaştırıldığında SFS, unlardaki karışım oranını ve taşış belirlemedeki en yüksek LOD ve LOQ değerlerine sahiptir, bu nedenle yeterli hassasiyete sahip olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.32. Paçal unlarının SFS verilerine ait PLSR modeli

Kimyasal analizlerde floresans yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlamasına rağmen geleneksel floresansın geniş yapısı spektrumun çok bileşenli kimyasal analizini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle daha dar ve keskin bir spektrum elde edilebilen SFS kullanılması ile bu problem çözülmektedir. SFS'nin geleneksel floresansla karşılaştırıldığında daha keskin ve dar spektrum pikleri vardır. Çok bileşenli analiz için SFS yöntemlerinin hassas, seçici, basit ve hızlı olmasına karşın, bazı durumlarda özellikle çok karmaşık karışımlar için başarısız olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni numunede bulunan farklı kimyasal türlerin etkileşimi sonucu spektral kayıpların

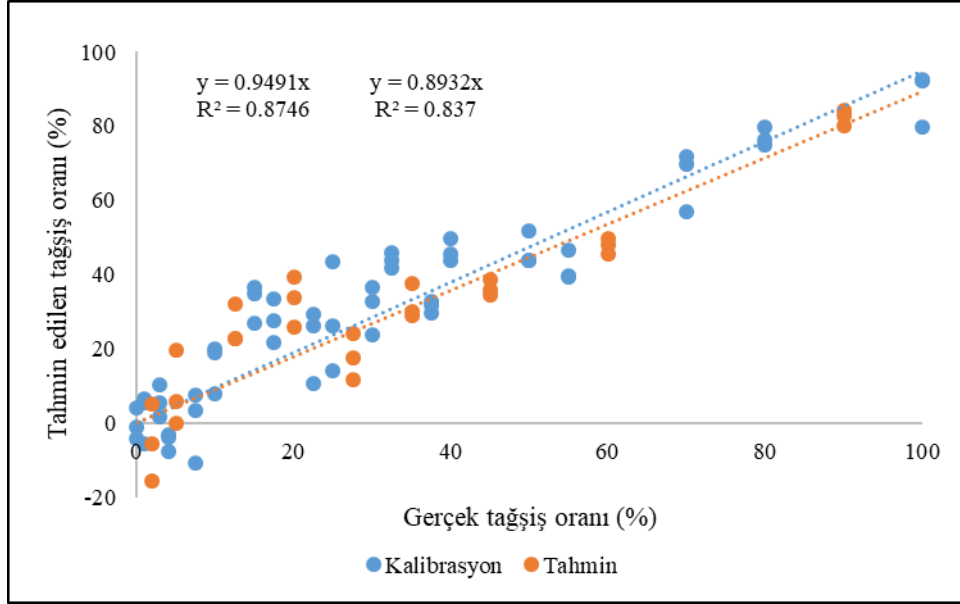
olmasıdır (Patra ve Mishra, 2002). SFS'nin paçal örneklerde performansının çokta iyi olmamasının nedeni bu olabilir.

Ön işlem modelleri, ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır ve elde edilen veriler Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. En düşük LOD (1.067) ve LOQ (3.234) değerleri normalleştirme ve düzgünleştirmeye ön işlemlerinin birlikte kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ancak modelin kalibrasyon R^2 (0.793) ve tahmin R^2 (0.759) değerleri diğer modellere göre düşüktür. Düşük R^2 değerleri, diğer modellere göre gerçek değer ile tahmini değeri arasında iyi bir ilişki olmadığının göstergesidir. En düşük RMSEC (9.488), RMSECV (12.591) ve RMSEP (10.750) değerlerinin ise türevlendirme ön işleminde olduğu görülmüştür. Ancak bu ön işlemde de LOD (9.758) ve LOQ (29.569) değerlerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle performans parametreleri en makul olan RMSEC (9.488), RMSECV (12.591) ve RMSEP (10.750) değerlerine sahip standart normal değişken ön işlemi seçilmiştir. Modelin LOD (2.628) ve LOQ (7.965) değerleri NIR ve ATR-FTIR'a göre yüksektir.

Çizelge 4.18. Makarna örneklerinin SFS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 %	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q- Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	4	99.96	9.354	11.911	20.549	99.98	0.02	0.874	3.033	9.192	0.887	0.817	0.851
AS	3	75.75	32.898	33.199	33.507	88.87	11.13	0.430	3.645	11.046	0.892	0.809	0.894
BSC	4	98.21	9.836	12.031	11.074	99.96	0.04	4.879	17.036	51.624	0.875	0.813	0.831
DERIV	5	99.93	8.306	12.230	8.516	99.98	0.02	2.842	9.758	29.569	0.911	0.807	0.906
DET	3	99.89	9.642	11.843	10.956	99.95	0.05	3.127	10.885	32.986	0.880	0.819	0.834
MC	4	85.60	32.600	32.784	32.902	93.89	6.11	1.147	9.484	28.741	0.917	0.834	0.903
NORM	4	99.96	9.814	12.522	11.110	99.98	0.02	0.576	2.011	6.094	0.875	0.798	0.837
SMO	4	99.97	10.900	12.099	11.058	100.0	0.00	1.217	4.246	12.866	0.846	0.811	0.834
SNV	4	99.98	9.488	12.591	10.750	99.95	0.05	0.756	2.628	7.965	0.883	0.795	0.846
SNV-MSC	4	99.88	9.484	12.584	10.752	99.95	0.05	0.761	2.648	8.023	0.883	0.765	0.846
NORM- SMO	3	99.97	12.622	13.888	13.532	99.99	0.01	0.294	1.067	3.234	0.793	0.751	0.759
NORM-DET	3	99.89	9.764	12.270	11.199	99.95	0.05	2.181	7.609	23.058	0.876	0.806	0.829

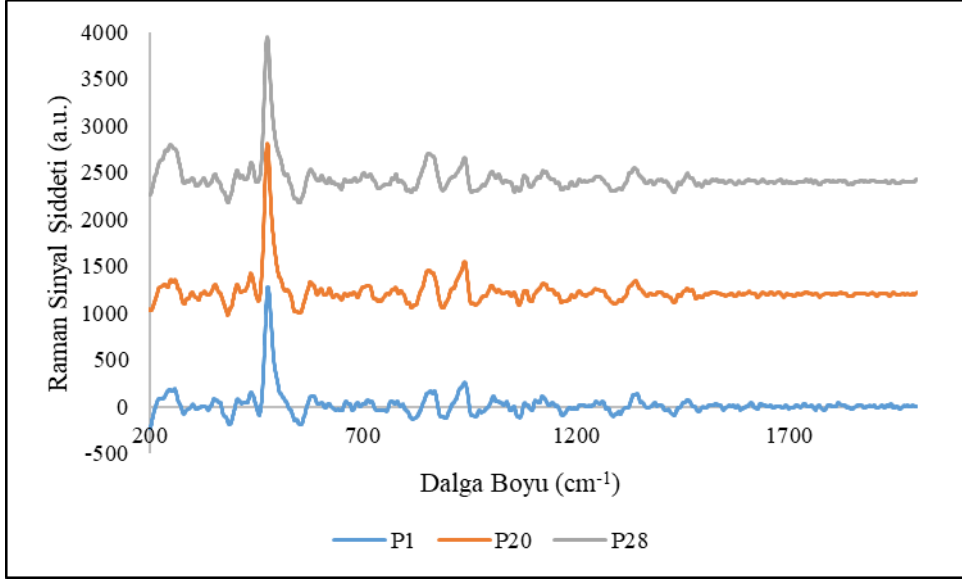
Makarna örneklerinin SFS verilerine ait PLSR modeli Şekil 4.33’de verilmiştir. Modelin istatistiksel değerlendirme sonuçlarının %20’nin üzerindeki taşışma tespit etmede daha başarılı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.33. Makarna örneklerinin SFS verilerine ait PLSR modeli

4.3.4. Raman Spektroskopisi

Makarnalık buğday unu örneğinden (%0 ekmeklik buğday, P1), %50 ekmeklik ve makarnalık buğday unu karışımı örneğinden (P20) ve ekmeklik buğday unu örneğinden (%100 ekmeklik buğday, P28) elde edilen Raman spektrumları Şekil 4.34’de gösterilmektedir. Tüm numuneler neredeyse aynı spektrumu göstermiştir, ancak spektrumların yoğunluğunun farklı olduğu görülmüştür. Ekmeklik buğday örneğinin (%100 ekmeklik buğday) bant yoğunluğu, saf durum buğday unu örneğinin (%0 ekmeklik buğday) bant yoğunluğuna göre daha yüksektir.



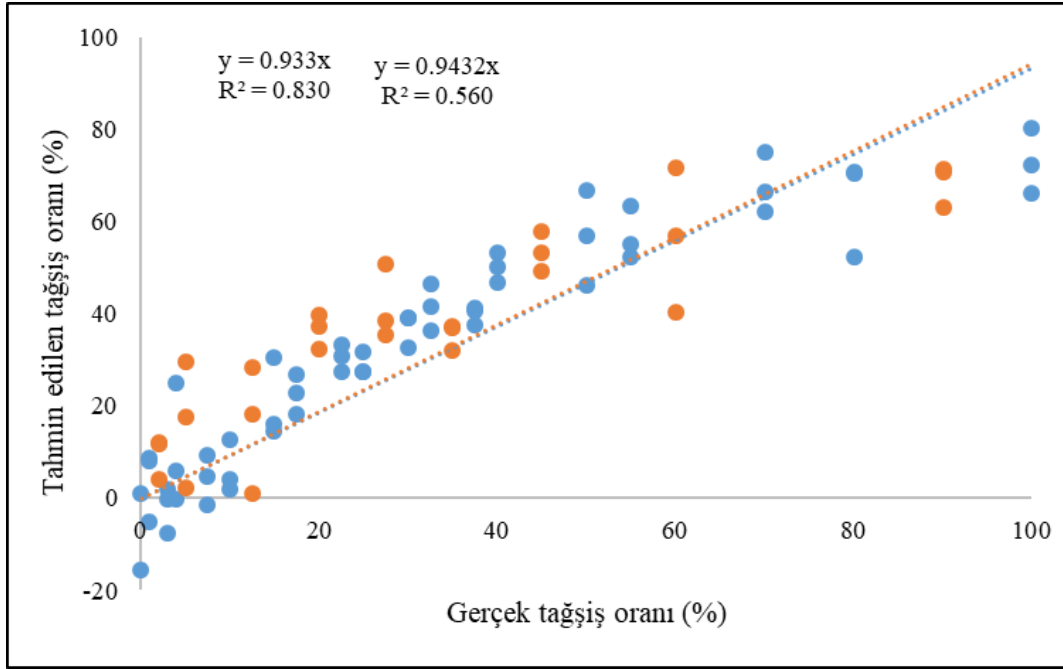
Şekil 4.34. Paçal un örneklerinin ortalama RS spektrumları

Tüm numuneler için spektrumların ana pikler 264 cm^{-1} , 476 cm^{-1} , 868 cm^{-1} , 939 cm^{-1} ve 1340 cm^{-1} de elde edilmiştir. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, yumuşak ve sert buğday unlarının spektrumu 279 , 486 , 764 , 935 , 1136 , 1256 , 1338 , 1463 ve 1661 cm^{-1} de pikler göstermektedir (Scudiero ve Morris, 2010). 279 cm^{-1} deki bant C-C'ye atfedilirken, $450\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler sistein ile ilişkili disülfür bağlarıdır. Tirozin için 850 cm^{-1} de pik görülmektedir. Glikoz ve fruktoz varlığında 847 ve 868 cm^{-1} arasındaki pik ortaya çıkmaktadır (Li-Chan, 1996; Scudiero ve Morris, 2010). 923 ve 1003 cm^{-1} deki bantlar, C-C bağı ve fenilalanin hakkında bilgi vermektedir. Pentozan varlığında $1076 - 1098\text{ cm}^{-1}$ arasında pikler meydana gelmektedir (Piot ve ark., 2002). RS verileri PLSR'nin ön işlemsiz ve birkaç ön işlem yöntemiyle analiz edilmiştir ve Çizelge 4.19'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. Paçal unların RS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	6	93.94	6.046	15.491	15.878	98.74	1.26	6.589	22.212	67.308	0.953	0.692	0.723
AS	3	16.68	32.746	36.408	32.863	31.30	68.70	4.303	36.043	10.222	0.905	0.476	0.658
BSC	4	96.50	10.443	14.673	13.674	99.05	0.95	3.700	13.017	39.446	0.859	0.722	0.772
DERIV	3	92.79	10.737	15.922	12.715	95.04	4.96	3.505	12.370	37.485	0.851	0.672	0.821
DET	6	94.07	5.936	15.318	15.917	98.68	1.32	4.415	14.869	45.056	0.954	0.698	0.722
MC	4	18.53	32.709	34.568	33.322	75.76	24.24	3.560	29.666	89.896	0.908	0.674	0.699
NORM	4	95.19	10.893	15.022	13.884	98.34	1.66	0.287	1.016	3.078	0.846	0.708	0.767
SMO	4	94.56	11.885	15.316	16.821	99.09	0.91	1.408	5.052	15.308	0.817	0.697	0.644
SNV	4	94.84	11.190	15.280	14.01	98.07	1.93	2.981	10.589	32.089	0.838	0.699	0.760
SNV-MSC	4	94.23	11.126	15.124	14.070	96.29	1.71	4.653	16.511	50.034	0.840	0.705	0.742
NORM-SMO	4	95.87	12.772	16.012	15.808	99.09	0.91	0.928	3.371	10.215	0.789	0.668	0.670
NORM-DET	4	95.26	10.103	14.831	14.500	97.51	2.49	2.120	7.428	22.510	0.868	0.716	0.751

Tüm modellerin performans parametreleri incelendiğinde diğer spektroskopik yöntemlere göre RMSEC, RMSECV, RMSEP değerlerinin yüksek, kalibrasyon ve tahmin R^2 değerlerinin düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca normalleştirme ön işlemi dışındaki tüm modellerde LOD ve LOQ değerlerinin çok yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle %1 tağış oranının tespiti için normalleştirme ön işleminin daha uygun olduğu bulunmuştur. Modelin kalibrasyon ve tahmin grafiği Şekil 4.35’de verilmiştir.



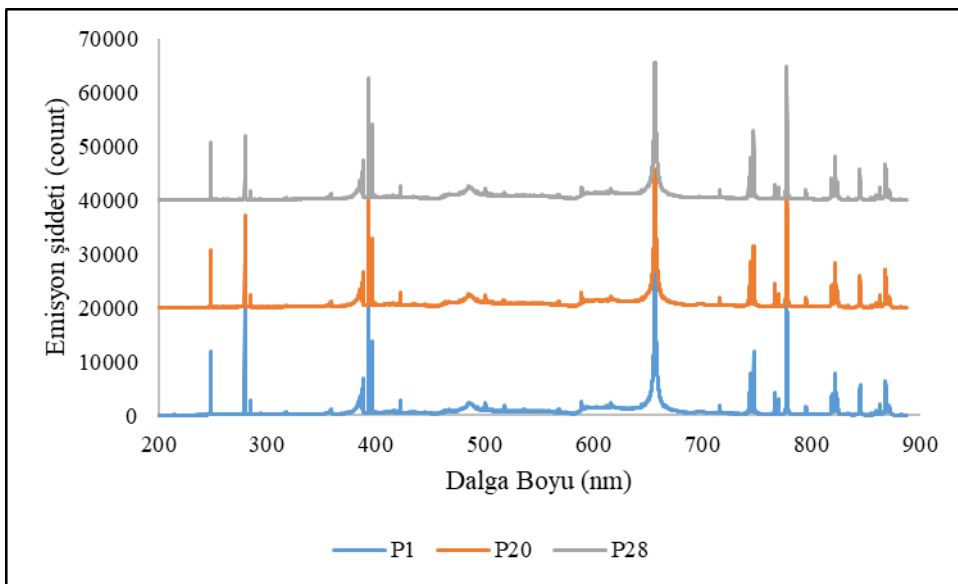
Şekil 4.35. Paçal unlarının RS verilerine ait PLSR modeli

Regresyon denklemi ile sıfır orijin eğimi, bilinen ve tahmin edilen sonuçlar arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. Normalleştirme ön işlemindeki kalibrasyon ve tahmin setlerinin R^2 değerleri 0.830 ve 0.560’dır. Kalibrasyon setinin verilerinin, tağış seviyesi %0-3 arasındayken kümeleştiği görülmüştür. Raman spektroskopisinin yüksek oranda tağış yapılmış karışımlardaki tağışın tespitinde, düşük tağış seviyesindeki karışımlarda tağış oranının tespitine göre daha başarılı olduğu görülmüştür. Modelin LOD ve LOQ değerlerinin %1.016 ve %3.078 olduğu bulunmuştur. Düşük LOD ve LOQ değerlerine rağmen, modelin tahmin doğruluğu oldukça düşüktür. Normalleştirme modeli için RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin 10.893, 15.022 ve 13.884 olduğu görülmüştür.

Diğer spektroskopik yöntemlerle karşılaştırıldığında %1 seviyesindeki tağışın belirlenmesinde hata değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle performans parametrelerine göre, Raman spektroskopisinin unlardaki karışım oranının belirlenmesinde, tahmin etme yeteneğinin tatmin edici olmadığı görülmüştür. Raman spektroskopisinin LIBS, FTIR ve NIR spektroskopisine kıyasla daha düşük duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni Raman'ın ölçtüğü kimyasal grupların ekmeklik ve makarnalık buğday unlarında benzer olması olabilir. Raman spektroskopisi tekniğinin, Raman sinyallerinin zayıflığından dolayı kullanımın sınırlı olduğu söylenebilir (McCreery, 2001). Raman spektroskopisi, saf buğday unlarının sınıflandırılmasındaki performansına benzer olarak makarnalık buğday unundaki farklı oranlarda ilave edilmiş ekmeklik buğday ilave oranının tespitinde kötü performansa sahip olduğu bulunmuştur.

4.3.5. Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

Makarnalık buğday unu örneğinden (%0 ekmeklik buğday, P1), %50 ekmeklik ve makarnalık buğday unu karışımı örneğinden (P20) ve ekmeklik buğday unu örneğinden (%100 ekmeklik buğday, P28) elde edilen LIBS spektrumları Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Her spektrumda benzer pikler görülsede, bazı noktadaki pik yoğunluğunda farklılıklar bulunmaktadır.



Şekil 4.36. Paçal un örneklerinin ortalama LIBS spektrumları

Tüm numuneler için emisyon hattından 247.796, 279.441, 388.285, 393.36, 422.7, 487.348, 589.245, 656.563, 715.949, 747.217, 766.891, 777.541, 795. 276, 822.018, 844.987, 868.432 nm'de bantlar elde edilmiştir. LIBS spektrumlarının bant atamaları Çizelge 4.20'de listelenmiştir (Temiz ve ark., 2018).

Çizelge 4.20. LIBS spektrumlarının muhtemel element tablosu

Gözlenen Emisyon Bandı (nm)	Muhtemel Element
247.769	Fe I (247.978)
279.5	Mg I (279.553)
388.285	Fe I (388.327)
393.36	Ca II (393.366), Ca I (393.529)
396.821	Ca II (396.8469)
422.626	Ca I (422.672), Ca II (422.815)
443.548	Ca I (443.569)
445.517	Ca I (445.478)
516.6	Fe I (516.748), Mg I (516.732)
527.096	Fe I (527.035)
589.173	Na I (588.995)
589.813	Na I (588.995)
610.298	Ca I (610.272)
612.231	Ca I (612.221), Fe I (612.790)
616.260	Ca I (616.217)
643.982	Ca I (643.907), Fe I (643.875)
646.268	Ca I (646.256)
716.065	Ca I (714.815), Fe I (714.814)
744.545	N I (744.229)
747.217	N I (746.831)
766.783	K I (766.489)
770.107	K I (769.8965)
777.541	O I (777.569)
819.221	Na I (819.482)
821.922	Mg I (821.3034), N I (821.634)

Literatürde; buğday unu için 202.548, 213.618, 257.610, 259.94, 285.213, 315.887, 324.755 ve 404.414 nm'deki bantların Zn, P, Mn, Fe, Mg, Ca, Cu ve K ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Peruchi ve ark., 2014). 279.500, 393.360, 656.618, 744.769, 747.328, 766.568 ve 777.224 nm'de bulunan tipik pikler ise Mg, Ca, H, N, Zn, K ve O'nun varlığında ortaya çıkmaktadır (Bilge ve ark., 2016; Sezer ve ark., 2017).

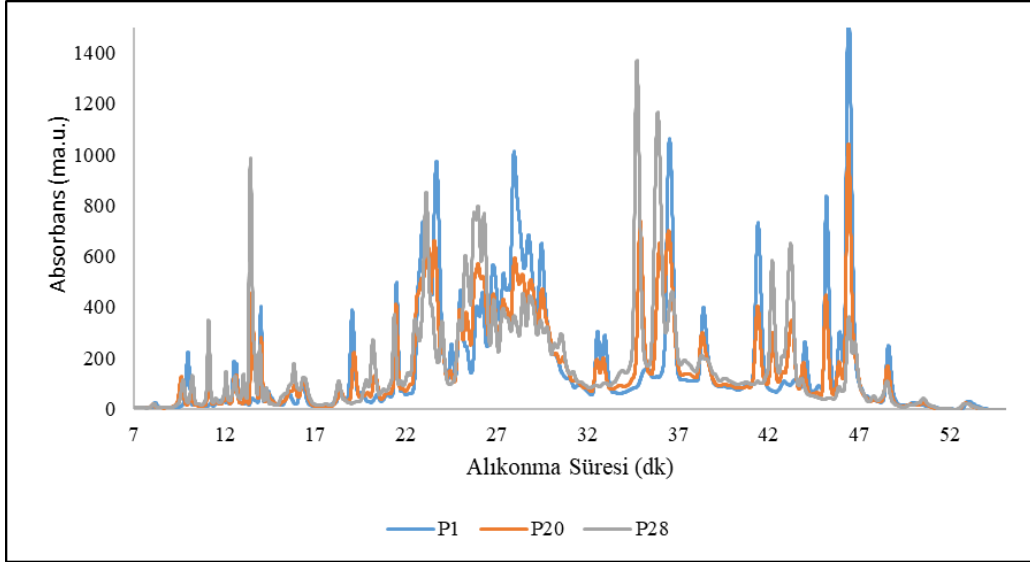
LIBS'in PLSR analizi sonucundaki performans parametreleri Çizelge 4.21'de gösterilmiştir. Ön işlemsiz ve ön işlemlilerle modeller incelendiğinde LIBS verileri için normalleştirme+düzgünleştirme kombinasyonlu modelin en iyi sonuç verdiği görülmüştür. Diğer modeller ile kıyaslandığında bu ön işlemlilerde yüksek R^2 değerleri elde edilmiştir.

Modelden elde edilen RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri ise 4.763, 6.149 ve 5.297 şeklindedir. LIBS ile un örneklerindeki gerçek ve tahmin edilen karışım oranında yüksek bir korelasyon elde edilmiştir.

Çizelge 4.21. Paçal unların LIBS verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	4	99.35	4.371	5.189	4.968	99.91	0.09	1.328	4.432	13.429	0.975	0.965	0.969
AS	6	27.89	31.673	32.463	29.944	85.72	14.28	0.517	3.938	11.934	0.994	0.933	0.946
BSC	4	99.20	4.424	5.232	5.008	99.90	0.10	1.348	4.496	13.625	0.975	0.965	0.969
DERIV	4	98.62	4.596	5.617	5.430	99.77	0.23	0.730	2.442	7.398	0.973	0.959	0.964
DET	4	99.16	4.422	5.225	5.143	99.89	0.11	1.382	4.613	13.979	0.975	0.965	0.968
MC	4	42.42	31.838	31.900	30.454	88.73	11.27	0.992	7.669	23.241	0.981	0.972	0.984
NORM	4	99.33	3.786	4.392	4.352	99.91	0.09	1.277	4.248	12.873	0.981	0.975	0.976
SMO	5	99.73	5.196	6.787	5.920	99.97	0.03	0.300	1.004	3.041	0.965	0.940	0.953
SNV		99.15	3.828	4.394	4.546	99.89	0.11	1.378	4.585	13.893	0.981	0.975	0.974
SNV-MSC	4	99.15	3.796	4.354	4.753	99.89	0.11	1.371	4.532	13.825	0.981	0.975	0.975
NORM-SMO	5	99.72	4.763	6.149	5.297	99.97	0.03	0.156	0.523	1.584	0.971	0.951	0.961
NORM-DET	4	99.13	3.842	4.439	4.496	99.89	0.11	1.329	4.423	13.402	0.981	0.974	0.975

oluşumu gözlemlenirken; makarnalık buğday unu ilavesi yüksek olan paçal unların kromatogram pikleri α/β -gliadin (25-40 dakika) ve γ -gliadin (40-55 dakika) bölgelerinde daha yoğundur.



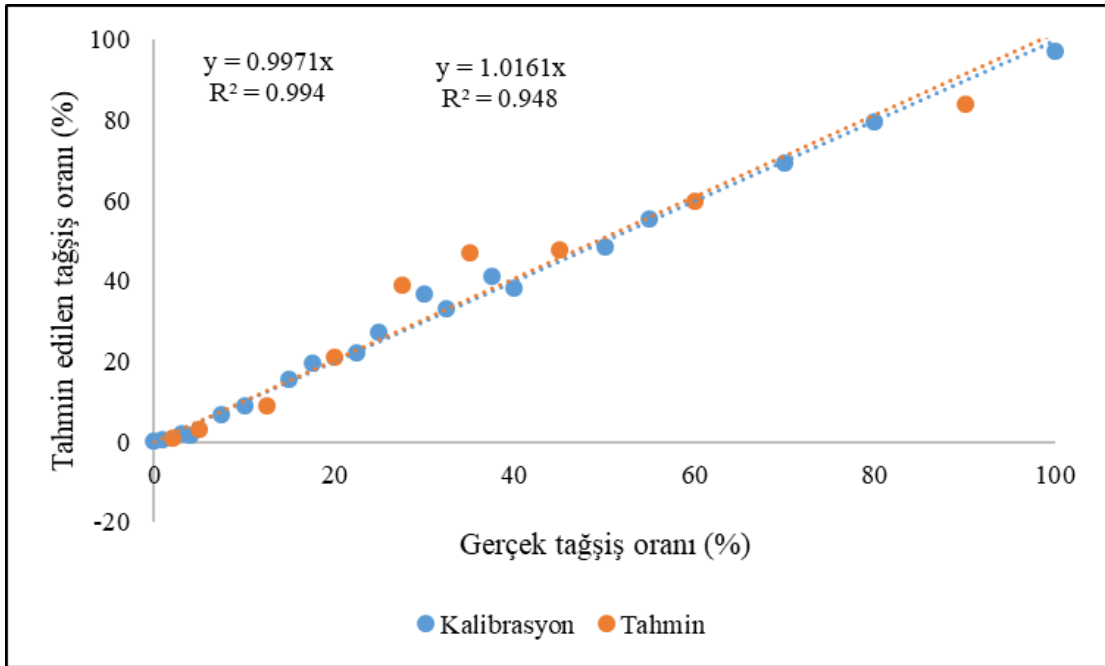
Şekil 4.38. Paçal un örneklerinin ortalama RP-HPLC kromatogramları

Kromatogram verileri PLSR analizi Çizelge 4.22’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en düşük LOQ ve LOD değerleri 1.391 ve 4.216 ile otomatik ölçeklendirme ön işlemi ile elde edilmiştir. Ancak bu modelin RMSEC (31.776), RMSECV(30.891), RMSEP (31.328) değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur. GD1(%) değerinin ise düşük olduğu (31.46) görülmektedir. Bu nedenle normalleştirme+yönsemeyi giderme kombine edilmiş ön işlem modeli seçilmiştir. Modelin LOD ve LOQ değerleri 3.139 ve 9.511’ken, RMSEC, RMSECV, RMSEP değerleri ise 2.251, 3.522 ve 6.109 şeklindedir.

Çizelge 4.22. Paçal unların RP-HPLC verilerine ait PLSR performans parametreleri

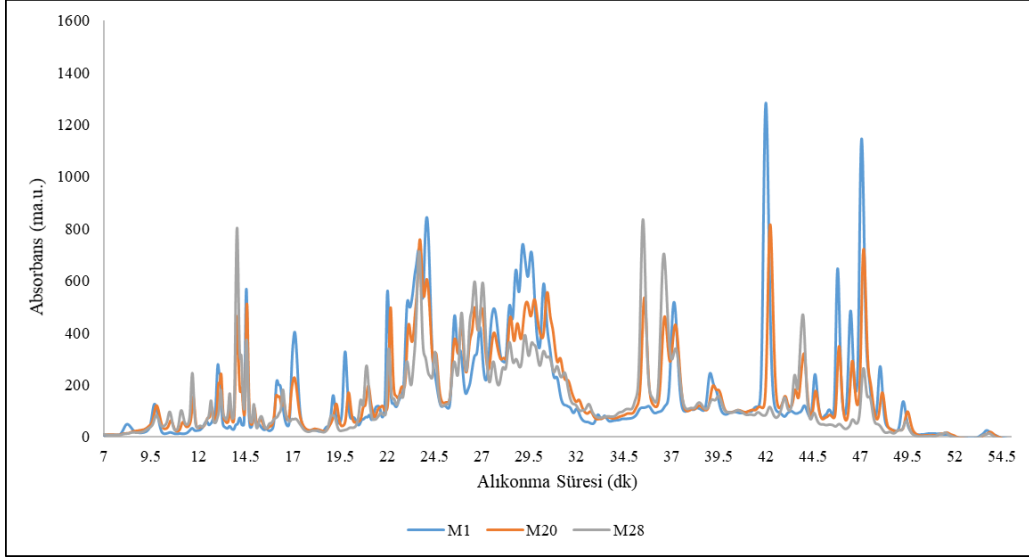
Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön işlemsiz	2	90.63	5.442	5.899	12.484	96.18	3.82	2.243	7.531	22.822	0.962	0.958	0.791
AS	2	31.46	31.776	30.891	31.328	58.16	41.84	0.181	1.391	4.216	0.986	0.893	0.916
BSC	2	87.85	4.773	6.072	10.464	94.91	5.09	0.750	2.509	7.604	0.971	0.956	0.850
DERIV	2	60.01	9.562	15.033	17.544	77.82	22.18	2.482	8.643	26.190	0.890	0.734	0.686
DET	2	85.34	4.595	6.494	9.587	94.05	5.95	0.990	3.308	10.025	0.973	0.949	0.873
MC	2	59.66	31.166	30.559	30.476	78.433	21.57	3.663	28.113	85.191	0.987	0.945	0.937
NORM	2	89.45	4.377	3.791	8.864	95.46	4.54	2.018	6.735	20.408	0.975	0.986	0.901
SMO	2	90.78	5.443	5.849	12.517	96.28	3.72	2.237	7.510	22.757	0.962	0.958	0.791
NORM-SMO	2	89.61	4.398	3.768	8.900	95.57	4.43	2.005	6.684	20.255	0.975	0.986	0.901
NORM-DET	2	83.48	2.251	3.522	6.109	92.94	7.06	0.948	3.139	9.511	0.994	0.990	0.952

Modelin kalibrasyon ve tahmin grafikerleri Şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4.39. Paçal unlarının RP-HPLC verilerine ait PLSR modeli

Makarna örneklerinin analizinde RP-HPLC yöntemi de kullanılmıştır. Şekil 4.40'da gösterildiği üzere irmiğe %0, %50 ve %100 oranında farina ilave edilerek hazırlanan makarnaların kromatogramlarında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Paçal unlardan elde edilen sonuçlara benzer olarak ekmeklik buğday ilavesi artıkça ω -gliadinler bölgesinde (5-25 dakika aralığındaki pikler) daha yoğun pik oluşumu gözlemlenirken; makarnalık buğday ilavesi yüksek olanların kromatogram pikleri α/β -gliadinler (25-40 dakika aralığındaki pikler) ve γ -gliadinler (40-55 dakika aralığındaki pikler) bölgelerinde daha yoğundur.



Şekil 4.40. Makarna örneklerinin ortalama RP-HPLC kromatogramları

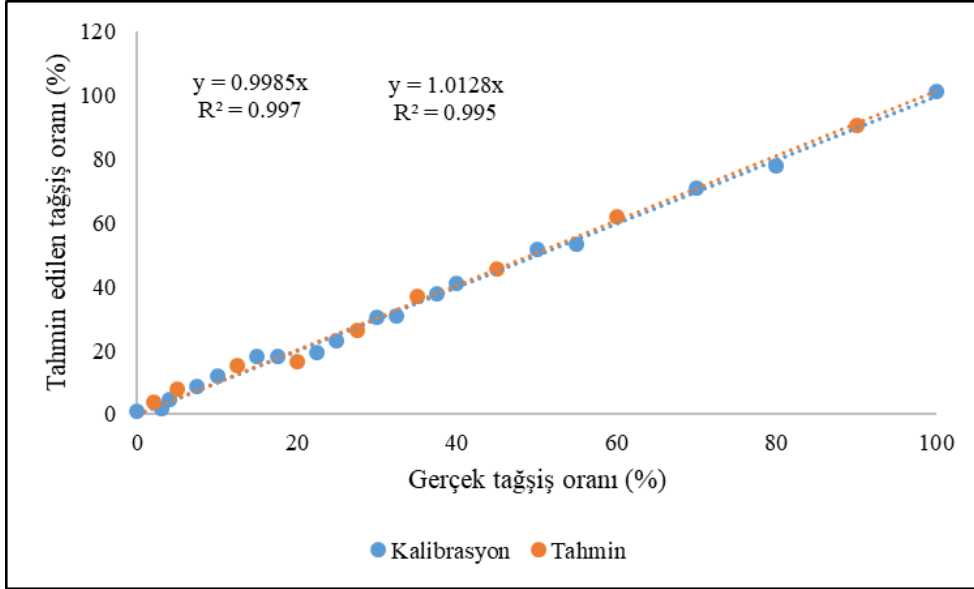
Çizelge 4.23'te RP-HPLC verilerine uygulanan tüm ön işlemler verilmiştir. Makarna örneklerinin RP-HPLC verilerinin PLSR analizi incelendiğinde en düşük LOD ve LOQ değerleri 6.473 ve 19.616 ile normalleştirme+düzgünleştirme modeli ile elde edilmiştir.

Paçal un ve makarna örneklerinin kromatografik sonuçları incelendiğinde makarna örneklerinin hata oranlarının, paçal unlarda ise LOD ve LOQ değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Paçal unların ve makarnanın kalibrasyon ve tahmin grafikerleri spektroskopik yöntemlerin kalibrasyon ve tahmin grafikerlerine göre oldukça doğrusaldır.

Çizelge 4.23. Makarna örneklerinin RP-HPLC verilerine ait PLSR performans parametreleri

Ön İşlemler	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
Ön İşlemsiz	3	92.34	2.851	3.264	3.587	98.23	1.77	2.527	8.355	25.317	0.989	0.986	0.990
AS	3	39.92	31.641	31.900	31.605	65.51	34.49	1.798	13.673	41.433	0.997	0.980	0.989
BSC	3	89.14	2.666	3.267	3.308	97.40	2.60	2.291	7.628	23.114	0.991	0.987	0.993
DERIV	4	47.78	3.990	9.421	8.321	88.69	11.31	3.920	13.053	39.553	0.979	0.888	0.915
DET	3	86.40	2.704	3.237	3.415	96.81	3.19	2.878	9.537	28.901	0.990	0.987	0.991
MC	2	64.64	31.717	31.483	31.605	78.89	21.11	1.302	9.945	30.137	0.991	0.983	0.995
NORM	3	91.73	1.629	3.067	2.131	98.24	1.76	2.016	6.659	20.178	0.997	0.995	0.995
SMO	3	92.54	2.838	3.236	3.594	98.32	1.68	2.433	8.063	24.433	0.990	0.987	0.990
NORM-SMO	3	91.94	1.623	2.037	2.102	98.33	1.67	1.960	6.473	19.616	0.997	0.995	0.995
NORM-DET	3	85.17	1.637	2.276	2.115	96.80	3.20	2.312	7.636	23.139	0.996	0.994	0.994

Bu modelin RMSEC, RMSECV, RMSEP değerlerinin sırasıyla 1.623, 2.037 ve 2.102 olduğu görülmektedir. Modelin kalibrasyon ve tahmin grafikerleri Şekil 4.41’de verilmiştir.



Şekil 4.41. Makarna örneklerinin RP-HPLC verilerine ait PLSR modeli

Seçilen ön işlemlere göre tüm cihazların performans parametreleri Çizelge 4.24’te verilmiştir. PLSR ile kombine edilmiş LIBS diğer yöntemlere göre en düşük LOQ (0.523) ve LOD (1.584) ile RMSEP (5.297) değerlerine sahip olmasının yanı sıra en yüksek tahmin R² değerine sahiptir. En yüksek kalibrasyon ve çapraz validasyon R² değerleri (0.994) ise RP-HPLC’den elde edilmiştir. Raman Spektroskopisinin un karışımlarındaki taşıyış oranını tespitinde en kötü performansa sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.24. Paçal un ve makarna örneklerinin PLSR performans parametreleri

Örnek	Cihazlar	GD	GD1 (%)	RMSEC	REMSECV	RMSEP	Hotelling's T ² (%)	Q-Residuals (%)	ST SP (%1)	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Tah-R ²
PAÇAL UN	NIR	4	100.00	6.442	7.0689	9.940	100.00	0.00	0.232	0.784	2.376	0.946	0.935	0.867
	ATR-FTIR	5	99.93	6.883	8.602	8.980	100.00	0.00	0.201	0.680	2.062	0.939	0.904	0.900
	SFS	4	99.91	5.461	7.094	6.497	99.98	0.02	1.611	5.409	16.391	0.961	0.935	0.950
	RS	4	95.19	10.893	15.022	13.884	98.34	1.66	0.287	1.016	3.078	0.846	0.708	0.767
	LIBS	5	99.72	4.763	6.149	5.297	99.97	0.03	0.156	0.523	1.584	0.971	0.951	0.961
	RP-HPLC	2	83.48	2.251	3.522	6.109	92.94	7.06	0.948	3.139	9.511	0.994	0.990	0.952
MAKARNA	NIR	5	100.00	9.595	12.926	8.747	100.00	0.00	0.310	1.079	3.270	0.881	0.783	0.895
	ATR-FTIR	5	99.80	7.781	9.417	8.908	99.98	0.02	0.137	0.494	1.496	0.922	0.885	0.903
	SFS	4	99.98	9.488	12.591	10.750	99.95	0.05	0.756	2.628	7.965	0.883	0.795	0.846
	RP-HPLC	3	91.94	1.623	2.037	2.102	98.33	1.67	1.960	6.473	19.616	0.997	0.995	0.995

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Makarna, dünya genelinde en çok üretilen ve tüketilen gıda ürünlerinden biridir. Her gün artan tüketici talebi ile doğru orantılı olarak makarna üretimi gün geçtikçe artan bir eğilim sergilemektedir.

Makarna üretiminde genel olarak %100 durum buğdayı (*Triticum durum*) buğdayı kullanılmaktadır. Durum buğdayı yoğun parlak sarı renge ve yüksek protein içeriğine sahip sert bir buğday türüdür. Bu niteliklerinin yanı sıra makarnalık buğday, makarna üretiminde istenen teknolojik özelliklere sahip olduğu için tercih edilmektedir. Ancak makarna üreticileri ekonomik kaygılardan ve makarna tüketimindeki artan talebi karşılamak için, makarna üretiminde teknolojik ve duyuşsal özellikleri zayıf ve hatta bazı ülkelerde makarna üretiminde kullanımı yasak olan ekmeklik buğdayı (*Triticum aestivum*) kullanılmaktadır. Özellikle İtalya, Fransa ve Türkiye gibi bazı ülkelerde yasal düzenlemelerle makarna üretiminde %100 durum buğdayı kullanılması zorunludur.

Etiketinde belirtilmeksizin makarna üretiminde ekmeklik buğday kullanılması, makarna tağşişi olarak kabul edilmektedir. Tağşişin tespitinde uzun zaman alıcı ve uzmanlık gerektiren klasik yöntemlere alternatif olarak hızlı, güvenilir ve son derece hassas yöntemlerin geliştirilmesine ve yaygınlaştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının birbirinden ayrılma potansiyellerinin ve tağşiş oranlarının araştırılması amacıyla spektroskopik ve kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda tez kapsamında 120 adet ekmeklik buğday unu, 119 adet makarnalık buğday unu, 28 adet paçal un ve 28 adet makarna örneğinde kemometrik yöntemlerle ile kombine edilmiş RS, NIRS, SFS, LIBS, ATR-FTIRS ile RP-HPLC teknikleri kullanılmıştır.

Tezin ilk aşamasında PCA ve PLS-DA ile kombine edilmiş veriler incelendiğinde buğday unu sınıflandırması için en iyi spektroskopik yöntemin %100 sınıflandırma oranına ve yüksek doğrulukla iyi bir tahmin modeline sahip olan SFS'nin olduğu görülmüştür. SFS tekniği ile ekmeklik ve makarnalık buğdayların birbirinden 1.000 duyarlılık ve özgünlük oranı ile net bir şekilde ayrıldığı görülmüştür. SFS'nin

performans parametrelerinden RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.164, 0.171 ve 0.194'tür. LIBS, ATR-FTIR ve NIR spektroskopileri ile buğday unu ayrımı için benzer sonuçlar elde edilmiş, ekmeklik ve makarnalık buğday örneklerinin oldukça net bir şekilde ayırt edildiği görülmüştür. ATR-FTIR ve NIR'in çapraz validasyon duyarlılık ve özgünlük değerleri 0.990 iken kalibrasyon ve tahmin duyarlılık ve özgünlük değerleri 1.000'dir. Raman spektroskopisinin ayırıştırma kabiliyetinin diğer spektroskopik yöntemlere göre daha sınırlı olduğu görülmüştür. RS tahmin grubunun duyarlılığı 0.350 iken çapraz validasyon duyarlılığı ve özgüllüğü 0.960 ve 1.000'dir. Ayrıca tez kapsamında örneklerin kapsamlı karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla RP-HPLC tekniği kullanılmıştır. RP-HPLC en düşük RMSEP (0.144) değerine sahiptir. Tüm cihazların performans parametreleri incelendiğinde en düşük RMSEP değerine sahip model kromatografiden elde edilirken, Hotelling's T2 ve %GD1 değerleri dikkate alındığında ise SFS'nin daha iyi performans sergilediği görülmektedir. SFS tekniği, buğday unlarının ayrımı için rutin analizlerde kullanılabilir, kolay, hızlı ve çevre dostu, yeşil bir metottür.

Makarnalık buğday ununa ilave edilen ekmeklik buğday ununun ilave oranının tespiti amacıyla PLSR ile kombine edilmiş spektroskopik cihazlar ve RP-HPLC kullanılmıştır. Makarnalık buğday ununa ilave edilen ekmeklik buğday ununun tespiti için en iyi spektroskopik yöntemin, R^2 değeri 0.961 olan LIBS olduğu tespit edilmiştir. Diğer spektroskopik yöntemlere göre en düşük LOD (0.523) ve LOQ (1.584) değerlerine sahip olmasının yanı sıra en yüksek kalibrasyon R^2 değeri (0.971) ve tahmin R^2 değerine (0.951) sahiptir. ATR-FTIR ve NIR spektroskopilerinin performansı birbirine benzerken, en yüksek LOD ve LOQ değerleri ise SFS'de elde edilmiştir. Buğdayların sınıflandırılmasındaki performansına benzer olarak makarnalık buğday ununa ilave edilen ekmeklik buğday ununun tespitinde Raman spektroskopisinin en kötü performansa sahip olduğu görülmüştür. RP-HPLC'den elde edilen veriler incelendiğinde tağşişin tespitinde en yüksek kalibrasyon R^2 (0.994) ve çapraz validasyon R^2 (0.990) değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük RMSEC (2.251) ve RMSECV (3.522) değerleri RP-HPLC'den elde edilmiştir. Ancak RP-HPLC ile bir makarna örneğinin tağşişinin tespitinde 1.5 saatten fazla zaman harcanmaktadır. Rutin analizlerde 1 dakikadan daha kısa sürede sonuç alma imkânı sağlaması nedeniyle spektroskopik yöntemlerin daha fazla tercih edilecektir. Sonuç olarak, buğdayın

ayrılmasındaki sonuca benzer olarak un karışımlarının tağışışının tespitinde hızlı, etkili ve yeşil yöntemler olarak PLSR ile kombinasyon halinde LIBS, NIRS veya ATR-FTIRS kullanılmasının avantaj sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca piyasada bazı durumlarda tersine tağışış yapılmaktadır. Ucuz ve kalitesiz irmik altı unu, ekmeklik buğday ununa ilave edilmektedir. Spektroskopik yöntemler ekmeklik buğday ununa ilave edilen irmik altı ununun hızlı bir şekilde tespit edilmesine de olanak sağlayabilir.

Makarnada irmiğe ilave edilen farinanın tespiti için en iyi spektroskopik yöntemin yüksek kalibrasyon R^2 (0.922), çapraz validasyon R^2 (0.885) ve tahmin R^2 (0.903) değerlerine sahip ATR-FTIRS olduğu bulunmuştur. Makarnadaki tağışışı tespit etmede NIRS ve SFS'nin kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin R^2 değerleri potansiyellerinin birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlenmiştir. Ancak NIRS'ın LOD (1.079) ve LOQ (3.270) değerleri SFS'nin LOD (2.628) ve LOQ (7.965) değerlerine göre daha iyidir. Makarna tağışışının tespiti amacıyla PLSR ile kombine edilmiş RP-HPLC tekniğinin sonuçları incelendiğinde ise kalibrasyon ve tahmin grafiklerinde oldukça doğrusal bir eğilim olduğu görülmüştür. RP-HPLC'nin kalibrasyon R^2 , çapraz validasyon R^2 ve tahmin R^2 değerleri sırasıyla 0.997, 0.995 ve 0.995'tir. Paçal unların sonuçlarına benzer olarak makarna tağışışında de en düşük RMSEC (1.623), RMSECV (2.037) ve RMSEP (2.103) değerleri RP-HPLC'den elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında ilk defa yaklaşık 300 örnekte çeşitli ön işleme tekniklerinde farklı kemometrik veri işleme yöntemleri ile kombine edilmiş 5 farklı spektroskopik yöntem kullanılarak saf çeşit ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının sınıflandırılması ve paçal un ile makarna örneklerinde tağışış belirleme performanslarının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca aynı örnekler kromatografik yöntem ile analiz edilerek kromatografik yöntem ile spektroskopik yöntemlerin performansları karşılaştırılmıştır. Kromatografik yöntemin ön hazırlık süreci hariç olmak üzere 1 örneğin analizi 1.5 saatten uzun sürmektedir. Spektroskopik analizlerde ise 1 örneğin analiz süresi 1 dakikanın altındadır. Hatta NIR spektroskopisinde 1 numunenin analizi sadece 6 saniye sürmektedir. Ayrıca spektroskopik yöntemlerde numune hazırlama basamağı bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçlarla, ekmeklik ve makarnalık buğday unlarının ayrılması, unda ve makarnada tağışışın saptanması ve miktarının belirlenmesinde klasik

yöntemlerden daha hızlı, spesifik uzmanlık gerektirmeyen, operasyon maliyeti düşük spektroskopik yöntemlerin kullanım potansiyelinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Saf buğday unlarının ayrılmasında SFS'nin en etkili yöntem olduğu görülmüştür. Paçal un örneklerinde tağşışın belirlenmesi için en iyi performansın ise LIBS'e ait olduğu saptanmıştır. Makarna örneklerindeki tağşışın tespiti için ise spektroskopik analizler içinde en iyi sonuç ATR-FTIRS ile elde edilmiştir. Un ve makarna fabrikalarında rutinde kalite parametrelerinin analizi amacıyla yaygın olarak kullanılan NIR spektroskopisi yönteminin makarna tağşışının tespitinde de rutin olarak kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Klasik metotların aksine yeşil teknolojiye sahip gıdaya zarar vermeden analiz gerçekleştiren spektroskopik yöntemlerin kullanılmasının ucuz, analiz süresinin kısa ve analizin zahmetsiz ve hızlı olması gibi özellikleri nedeniyle T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından laboratuvarlarda kullanılması önerilebilir. Böylelikle Bakanlık makarna taklit ve tağşış yapan firmaları hızlı bir şekilde tespit edebilecek ve kamuoyu ile hızlı bir şekilde paylaşabilecektir. Bakanlık tarafından açıklanan taklit ve tağşış tespit edilen ürünlere makarna da dahil edilmelidir. Bu yöntemlerin kullanılması Türk Gıda Kodeksi Makarna Tebliği'ne uygun bir şekilde üretim yapılmasına, yasanın işletilmesine ve uygulanmasına olanak sağlayacaktır. Böylelikle kemometrik yöntemlerle kombine edilmiş spektroskopik yöntemler kullanılarak makarna tağşışının tespiti ile sektörde haksız rekabetin önüne geçilerek güvenilir makarna üretimi ve tüketimi sağlanabilir. Ekmeklik ve makarnalık buğdayların ayrılması ile un ve makarnada tağşışın tespiti için klasik yöntemlere alternatif oluşturmak için kullanılan spektroskopik analiz yöntemlerinin hızlı, güvenilir, kullanıcı dostu yöntemler olduğu ortaya konulmuştur. Bu araştırma ile ilk kez un ve makarnada farklı spektroskopik yöntemlerin performansları gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- AACC, Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. 10th Ed, The Association: St. Paul, MN. **2000**.
- Abdi, H., Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression), Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 2(1), 97-106, **2010**.
- Aguilar, M. I., HPLC of Peptides and Proteins, In HPLC of Peptides and Proteins (pp. 3-8). Springer, Totowa, NJ, **2004**.
- Ahmad, M. H., Nache, M., Waffenschmidt, S., & Hitzmann, B., A fluorescence spectroscopic approach to predict analytical, rheological and baking parameters of wheat flours using chemometrics, Journal of Food Engineering, 182, 65-71, **2016**.
- Alary, R., Serin, A., Duviau, M.P., Jourdrier, P., and Gautier, M.F., Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), Cereal chemistry 79.4, 553-558, **2002**.
- Anonim, United State Wheat Associates, <https://www.uswheat.org/>, **(Erişim tarihi: 08.07.2019a)**.
- Anonim, OBA Makarna, <https://www.obamakarna.com.tr/Makarnanin-Hikayesi.html>, **(Erişim tarihi: 08.07.2019b)**.
- Anonim, International Pasta Organisation, www.internationalpasta.org/index.aspx?id=6, **(Erişim tarihi: 08.07.2019c)**.
- Anonim, National Pasta Association (NPA), www.ilovepasta.org/history/, **(Erişim tarihi: 08.07.2019d)**.
- Anonim, Wheat Foods Council, <http://www.wheatfoods.org/resources/nutrition-and-health/>, **(Erişim tarihi: 08.07.2019e)**.
- Anonim, An introduction to Raman for the infrared spectroscopist, Inphotonics Technical Note No. 11, Norwood, MA (www.inphotonics.com/technote11.pdf), **(Erişim tarihi: 08.07.2019f)**.
- Anonim, <https://www.statista.com/outlook/40060100/100/pasta-noodles/worldwide#market-volume>, **(Erişim tarihi: 08.07.2019g)**.
- Anonim, https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx, **(Erişim tarihi: 07.07.2020)**.
- Aristoy M.C. and Toldrá, F., Amino Acids, Handbook of Food Analysis-Two Volume Set, CRC Press, **2015**.
- Armbruster, D. A., Tillman, M. D., & Hubbs, L. M., Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods

- exemplified with GC-MS assays of abused drugs, *Clinical chemistry*, 40(7), 1233-1238, **1994**.
- Arslan, F. N., and Çağlar, F., Attenuated total reflectance–fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy combined with chemometrics for rapid determination of cold-pressed wheat germ oil adulteration, *Food Analytical Methods*, 12(2), 355-370, **2019**.
- Balan, B., Dhaulaniya, A. S., Jamwal, R., Sodhi, K. K., Kelly, S., Cannavan, A., & Singh, D. K., Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for detection and quantification of formalin in cow milk, *Vibrational Spectroscopy*, 107, 103033, **2020**.
- Ballabio, D., & Todeschini, R., Multivariate classification for qualitative analysis, *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 83, e102, **2009**.
- Bekes, F., Gianibelli, M.C., and Wrigley, C., Wheat: Grain Proteins and Flour Quality, *Encyclopedia of Grain Science*, Eds: Wrigley, C. et al., Elsevier Ltd., 416-423, Amsterdam, **2004**.
- Bergman, C.J., Gualberto, D.G., and Weber C.W., Development of a high-temperature-dried soft wheat pasta supplemented with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), Cooking quality, color, and sensory evaluation, *Cereal chemistry* 71.6, 523-527, **1994**.
- Bertrand, D., Novales, B., Devaux, M.F., Robert, P., Abecassis, J., Davies, A.M.C., and Williams, P.C., Discrimination of durum wheat products for quality control, In *Near Infrared Spectroscopy: The future waves. Proceedings of the 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, Montreal. P, 430-435, **1996**.
- Bertrand, D., Robert, P., and Loisel, W., Identification of some wheat varieties by near-infrared reflectance spectroscopy, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(11), 1120-1124, **1985**.
- Beta, T., Grain Production and Consumption Overview, *Encyclopedia of Grain Science*, Eds: Wrigley, C. et al., Elsevier Ltd., 61-70, Amsterdam, **2004**.
- Bilge, G., Sezer, B., Eseller, K. E., Berberoglu, H., Koxsel, H., & Boyaci, I. H., Ash analysis of flour sample by using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 124, 74-78, **2016a**.
- Bilge, G., Sezer, B., Eseller, K. E., Berberoglu, H., Topcu, A., & Boyaci, I. H., Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy, *Food chemistry*, 212, 183-188, **2016b**.
- Blazek, J., Jirsa, O, and Hruskova, M., Prediction of wheat milling characteristics by near-infrared reflectance spectroscopy, *Czech journal of food sciences*, 23(4), 145, **2005**.

- Boyacı, I. H., Genis, H. E., Guven, B., Tamer, U., & Alper, N., A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(8), 1171-1176, **2012**.
- Boyacı, I. H., Temiz, H. T., Geniş, H. E., Soykut, E. A., Yazgan, N. N., Güven, B., ... & Şeker, F.C.D., Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis, *Rsc Advances*, 5(70), 56606-56624, **2015**.
- Boyacı, I. H., Temiz, H. T., Uysal, R. S., Velioglu, H. M., Yadegari, R. J., & Rishkan, M. M., A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy, *Food chemistry*, 148, 37-41, **2014**.
- Brereton, R. G., *Applied chemometrics for scientists*, John Wiley & Sons, **2007**.
- Bro, R., Rinnan, Å., & Faber, N. K. M., Standard error of prediction for multilinear PLS: 2. Practical implementation in fluorescence spectroscopy, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 75(1), 69-76, **2005**.
- Bryan, G.J., Dixon, A., Gale, M.D., and Wiseman, G., A PCR-based method for the detection of hexaploid bread wheat adulteration of durum wheat and pasta, *Journal of Cereal Science*, 28(2), 135-145, **1998**.
- Casazza, A.P., Morcia, C., Ponzoni, E., Gavazzi, F., Benedettelli, S., and Breviario, D., A reliable assay for the detection of soft wheat adulteration in Italian pasta is based on the use of new DNA molecular markers capable of discriminating between *Triticum aestivum* and *Triticum durum*, *Journal of cereal science*, 56(3), 733-740, **2012**.
- Cen, H., and He, Y., Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality, *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 72-83, **2007**.
- Cengiz, M. F., and Durak, M. Z., Rapid detection of sucrose adulteration in honey using Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 52(5), 267-273, **2019**.
- Cheng, Y., Dong, Y., Wu, J., Yang, X., Bai, H., Zheng, H., ... & Li, M., Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(2), 199-202, **2010**.
- Ciurczak, E.W., *Principles of near-infrared spectroscopy*, Handbook of near-infrared analysis, Second edition, CRC press, 7-18, **2001**.
- Cocchi, M., Durante, C., Foca, G., Marchetti, A., Tassi, L., and Ulrici, A., Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration. *Talanta*, 68(5), 1505-1511, **2006**.
- Cocciardi, R. A., *Evaluation of Single-bounce Attenuated Total Reflectance/Fourier Transform Infrared and Two-dimensional Correlation Spectroscopy in Quantitative Analysis (Doctoral dissertation, McGill University)*, **2003**.

- Costa, V. C., de Babos, D. V., de Aquino, F. W. B., Virgílio, A., Amorim, F. A. C., & Pereira-Filho, E. R., Direct determination of Ca, K and Mg in cassava flour samples by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), *Food analytical methods*, 11(7), 1886-1896, **2018**.
- Cremers, D. A., & Radziemski, L. J., Quantitative LIBS analysis. *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, 185, 222, **2013**.
- Dankowska, A., Małecka, M., & Kowalewski, W., Application of synchronous fluorescence spectroscopy with multivariate data analysis for determination of butter adulteration, *International journal of food science & technology*, 49(12), 2628-2634, **2014**.
- Dankowska, A., Małecka, M., & Kowalewski, W., Detection of plant oil addition to cheese by synchronous fluorescence spectroscopy, *Dairy science & technology*, 95(4), 413-424, **2015**.
- De Girolamo, A., Lippolis, V., Nordkvist, E., & Visconti, A., Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy, *Food Additives and Contaminants*, 26(6), 907-917, **2009**.
- De Lima, A.B.S., Batista, A.S., De Jesus, J.C., De Jesus Silva, J., De Araújo, A.C.M., and Santos, L.S., Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near-infrared spectroscopy and multivariate modelling, *Food Control*, 107, 106802, **2020**.
- Dell'Interno, Ministero, DPR 187/01 of 9th February 2001: regulations for the review of legislation on production and marketing of flour and pasta, Ministero Dell'Interno, Roma, **2001**.
- Delwiche, S.R., Chen, Y.R., and Hruschka, W.R., Differentiation of hard red wheat by near-infrared analysis of bulk samples, *Cereal chemistry*, 72(3), 243-247, **1995**.
- De Noni, I., De Bernardi, G., and Pellegrino, L., Detection of common dash wheat (*Triticum aestivum*) flour in Durum-wheat (*Triticum durum*) semolina by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) of specific albumins, *Food chemistry*, 51(3), 325-329, **1994**.
- Dufour, E., Principles of infrared spectroscopy, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 3-27, **2009**.
- Eckardt, N.A., Evolution of domesticated bread wheat, *The Plant Cell*, Vol. 22, 993-993, **2010**.
- Er, S. V., Eksi-Kocak, H., Yetim, H., and Boyaci, I. H., Novel spectroscopic method for determination and quantification of saffron adulteration, *Food analytical methods*, 10(5), 1547-1555, **2017**.
- Ertokuş, G. P., Gıda ürünlerindeki renk maddelerinin uv-görünür alan spektroskopisi, potansiyometri ve yüksek performans sıvı kromatografisi ile incelenmesi ve elde

- edilen verilerin çoklu kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi (Doctoral dissertation, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü), **2011**.
- Ertugay Z., Buğday, Un ve Ekmek Arasındaki Kalite İlişkileri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 13, 165-175, **1982**.
- European Union (E.U.) Commission Regulation, Official Journal of the European Community, L136, **1994**.
- Faber, N. M., Song, X. H., & Hopke, P. K., Sample-specific standard error of prediction for partial least squares regression, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22(5), 330-334, **2003**.
- Firmani, P., De Luca, S., Bucci, R., Marini, F., and Biancolillo, A., Near infrared (NIR) spectroscopy-based classification for the authentication of Darjeeling black tea, Food control, 100, 292-299, **2019**.
- Frankhuizen, R., NIR Analysis of Dairy Products, Handbook of near-infrared analysis, Second edition, CRC press, 499-, 529, **2001**.
- Fuad, T., and Prabhasankar, P., Role of ingredients in pasta product quality: A review on recent developments, Critical Reviews in food science and nutrition, 50(8), 787-798, **2010**.
- García-Olmedo, F., and García-Faure, R., A new method for the estimation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in pasta products. Lebensm-Wiss+ Technol, 2, 94-96, **1969**.
- Geladi, P., & Kowalski, B. R., Partial least-squares regression: a tutorial, Analytica chimica acta, 185, 1-17, **1986**.
- Genis, D.O., Bilge, G., Sezer, B., Durna, S., and Boyaci, I.H., Identification of cow, buffalo, goat and ewe milk species in fermented dairy products using synchronous fluorescence spectroscopy, Food Chemistry, 284, 60-66, **2019**.
- Ghosh, N., Verma, Y., Majumder, S. K., & Gupta, P. K., A fluorescence spectroscopic study of honey and cane sugar syrup, Food science and technology research, 11(1), 59-62, **2005**.
- Giacco, R., Vitale, M., and Riccardi, G., Pasta: Role in diet, The Encyclopedia of Food and Health; Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F., Eds, 242-245, **2016**.
- Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., and Severcan, F., Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis, Food chemistry, 170, 234-240, **2015**.
- Gowen, A. A., Downey, G., Esquerre, C., & O'Donnell, C. P., Preventing over-fitting in PLS calibration models of near-infrared (NIR) spectroscopy data using regression coefficients, Journal of Chemometrics, 25(7), 375-381, **2011**.

- Ibrahim, M.A., Al-Hmoud, N.D., Al-Rousan, H., and Hayek, B.O., Detection of durum wheat pasta adulteration in the Jordanian Market by polymerase chain reaction technology, *Am. J. Food Technol*, 6, 492-499, **2011**.
- Ilaslan, K., Boyaci, I. H., & Topcu, A., Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy, *Food Control*, 48, 56-61, **2015**.
- International Pasta Organization (IPA), *The World Pasta Industry Status Report*, **2013**.
- Ismail, B. P., *Basic Principles of Chromatography*, In *Food Analysis*, Springer, Cham., Boston, MA, 185-211, **2017**.
- Jawaid, S., Talpur, F. N., Sherazi, S. T. H., Nizamani, S. M., and Khaskheli, A. A., Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy, *Food chemistry*, 141(3), 3066-3071, **2013**.
- Jespersen, B.P.M., and Munck, L., Cereals and cereal products: chapter 11. In *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, Academic Press, 275-319, **2009**.
- Jiao, X., Meng, Y., Wang, K., Huang, W., Li, N., & Liu, T. C. Y., Rapid Detection of Adulterants in Whey Protein Supplement by Raman Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis, *Molecules*, 24(10), 1889, **2019**.
- Jiménez-Carvelo, A. M., Osorio, M. T., Koidis, A., González-Casado, A., and Cuadros-Rodríguez, L., Chemometric classification and quantification of olive oil in blends with any edible vegetable oils using FTIR-ATR and Raman spectroscopy, *LWT*, 86, 174-184, **2017**.
- Kamil, M. M., Hussien, A. M., Ragab, G. H., and Khalil, S. K. H., Detecting adulteration of durum wheat pasta by FT-IR spectroscopy, *Journal of American Science*, 7(6), 573-578, **2011**.
- Karoui, R., Cartaud, G., & Dufour, E., Front-face fluorescence spectroscopy as a rapid and nondestructive tool for differentiating various cereal products: a preliminary investigation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6), 2027-2034, **2006**.
- Karoui, R., and Blecker, C., Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems—a review, *Food and Bioprocess technology*, 4(3), 364-386, **2011**.
- Knödler, M., Most, M., Schieber, A., and Carle, R., A novel approach to authenticity control of whole grain durum wheat (*Triticum durum* Desf.) flour and pasta, based on analysis of alkylresorcinol composition, *Food chemistry*, 118(1), 177-181, **2010**.
- Larkin P., *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation*, **2011**.
- Law, D.P., and Tkachuk, R., Near-infrared diffuse reflectance spectra of wheat and wheat components, *CIMMYT*, No. 77-165358, **1977**.

- Li, B., Wang, H., Zhao, Q., Ouyang, J., and Wu, Y., Rapid detection of authenticity and adulteration of walnut oil by FTIR and fluorescence spectroscopy: A comparative study. *Food chemistry*, 181, 25-30, **2015**.
- Li, Y.S., and Church, J.S., Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials, *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 29-48, **2014**.
- Li, S., Shao, Q., Lu, Z., Duan, C., Yi, H., and Su, L., Rapid determination of crocins in saffron by near-infrared spectroscopy combined with chemometric techniques, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190, 283-289, **2018**.
- Li-Chan, E. C. Y., The applications of Raman spectroscopy in food science, *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 361-370, **1996**.
- Lin, M., Rasco, B.A., Cavinato, A.G., and Al-Holy, M.G., Chapter 6—Infrared (IR) spectroscopy—near-infrared spectroscopy and mid-infrared spectroscopy, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 119-143, **2009**.
- Liu, J., Ren, J., Liu, Z. M., and Guo, B. H., A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk, *Food chemistry*, 172, 251-256, **2015**.
- Lohumi, S., Lee, S., Lee, H., and Cho, B.K., A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 85-98, **2015**.
- Long, G. L., & Winefordner, J. D., Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Analytical chemistry*, 55(7), 712A-724A, **1983**.
- Lundanes, E., Reubsaet, L., & Greibrokk, T., *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, **2013**.
- Mabood, F., Boqué, R., Folcarelli, R., Busto, O., Jabeen, F., Al-Harrasi, A., & Hussain, J., The effect of thermal treatment on the enhancement of detection of adulteration in extra virgin olive oils by synchronous fluorescence spectroscopy and chemometric analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161, 83-87, **2016**.
- Malalgoda R. M.M., Investigation Of Protein Composition In Historical And Modern Hard Red Spring Wheat Cultivars, Master Thesis, North Dakota State University Graduate School, **2016**.
- Manley, M., Van Zyl, L., and Osborne, B.G., Using Fourier transform near infrared spectroscopy in determining kernel hardness, protein and moisture content of whole wheat flour, *Journal of near infrared spectroscopy*, 10(1), 71-76, **2002**.
- Markiewicz-Keszyccka, M., Cama-Moncunill, X., Casado-Gavaldà, M. P., Dixit, Y., Cama-Moncunill, R., Cullen, P. J., & Sullivan, C., Laser-induced breakdown

- spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 65, 80-93, **2017**.
- Marquardt, B. J., & Wold, J. P., Raman analysis of fish: a potential method for rapid quality screening, *LWT-Food Science and Technology*, 37(1), 1-8, **2004**.
- Martelli, M. R., Brygo, F., Sadoudi, A., Delaporte, P., & Barron, C., Laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics: a novel potential method to analyze wheat grains, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7126-7134, **2010**.
- Matsuo, R.R., Durum wheat: its unique pasta-making properties, *Wheat*. Springer, Boston, MA, 169-178, **1994**.
- McCarthy, P. K., Scanlon, B. F., Lumley, I. D., & Griffin, M., Detection and quantification of adulteration of durum wheat flour by flour from common wheat using reverse phase HPLC., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(2), 211-226, **1990**.
- McCarthy, W. J., & Kemeny, G. J., Fourier Transform Spectrophotometers in the Near-Infrared, *Practical Spectroscopy Series*, 27, 71-90, **2001**.
- McClelland, A., & Mankin, M., Spectroscopy: So Many Squiggly Lines, In *Optical Measurements for Scientists and Engineers: A Practical Guide*, 110-188, Cambridge: Cambridge University Press, **2018**.
- McCreery, R. L., Raman spectroscopy for chemical analysis, *Measurement science and technology*, 12(5), 653, **2001**.
- Miralbés, C., Discrimination of European wheat varieties using near infrared reflectance spectroscopy, *Food chemistry*, 106(1), 386-389, **2008**.
- Moncayo, S., Manzoor, S., Rosales, J. D., Anzano, J., & Caceres, J. O., Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), *Food chemistry*, 232, 322-328, **2017**.
- Morris, S.R., Grain: Quality attributes. *Encyclopedia of Grain Science*, Eds: Wrigley, C. et al., Elsevier Ltd., 238-254, Amsterdam, **2004**.
- Mujica, L. E., Rodellar, J., Fernandez, A., & Güemes, A., Q-statistic and T²-statistic PCA-based measures for damage assessment in structures. *Structural Health Monitoring*, 10(5), 539-553, **2011**.
- Mutlu, A.C., Boyacı, I.H., Genis, H.E., Ozturk, R., Basaran-Akgul, N., Sanal, T., and Evlice, A.K., Prediction of wheat quality parameters using near-infrared spectroscopy and artificial neural networks, *European food research and technology*, 233(2), 267-274, **2011**.
- Nedeljković, A., Rösch, P., Popp, J., Miočinović, J., Radovanović, M., & Pudja, P., Raman spectroscopy as a rapid tool for quantitative analysis of butter adulterated with margarine, *Food analytical methods*, 9(5), 1315-1320, **2016**.

- Nielsen, S. S., & Talcott, S. T., High-Performance Liquid Chromatography, In Food analysis laboratory manual (pp. 77-85), Springer, Cham, **2017**.
- Noll, R., Laser-induced breakdown spectroscopy, In Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (pp. 7-15). Springer, Berlin, Heidelberg, **2012**.
- Nunes, K. M., Andrade, M. V. O., Santos Filho, A. M., Lasmar, M. C., and Sena, M. M., Detection and characterisation of frauds in bovine meat in natura by non-meat ingredient additions using data fusion of chemical parameters and ATR-FTIR spectroscopy, Food chemistry, 205, 14-22, **2016**.
- Oleson, B.T., World wheat production, and pastazation and trade, In: Wheat, Springer, Boston, MA, 1-11, **1994**.
- Osborne, B.G., NIR Analysis of Baked Products, Handbook of near-infrared analysis, Second edition, CRC press, 475-498, **2001**.
- Ozulku, G., Yildirim, R. M., Toker, O. S., Karasu, S., and Durak, M. Z., Rapid detection of adulteration of cold pressed sesame oil adulterated with hazelnut, canola, and sunflower oils using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometric, Food Control, 82, 212-216, **2017**.
- Pallone, J. A. L., dos Santos Caramês, E. T., and Alamar, P. D., Green analytical chemistry applied in food analysis: alternative techniques, Current Opinion in Food Science, 22, 115-121, **2018**.
- Parlatan U., Raman Cımbızlama Spektrometresi Kullanılarak Tekil Biyolojik Hücrelerdeki Farklılıkların Çok Değişkenli Analiz Yöntemi ile Saptanması, Yüksek Lisans, **2010**.
- Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Sekhar, G. C., & Thomas, R., Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values, Indian journal of ophthalmology, 56(1), 45, **2008**.
- Patra, D., & Mishra, A. K., Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21(12), 787-798, **2002**.
- Paulsen, G.M., and Shroyer, J.P., Wheat Agronomy. Encyclopedia of grain science, Eds: Wrigley, C. et al., Elsevier Ltd, 337-347, Amsterdam, **2004**.
- Peruchi, L. C., Nunes, L. C., de Carvalho, G. G. A., Guerra, M. B. B., de Almeida, E., Rufini, I. A., ... & Krug, F. J., Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 100, 129-136, **2014**.
- Porep, J.U., Kammerer, D.R., and Carle, R., On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production, Trends in Food Science & Technology, 46(2), 211-230, **2015**.

- Poulli, K. I., Mousdis, G. A., & Georgiou, C. A., Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386(5), 1571-1575, **2006**.
- Rakovský, J., Čermák, P., Musset, O., & Veis, P., A review of the development of portable laser induced breakdown spectroscopy and its applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 101, 269-287, **2014**.
- Reuhs, B. L., High-performance liquid chromatography, In *Food analysis*, pp. 213-226, Springer, Boston, MA, **2017**.
- Resmini, P., Determination of the content of soft wheat in macaroni and alimentary paste by electrophoretic analysis of protein components, *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 5(5), 404, **1969**.
- Richardson, P. I., Muhamadali, H., Ellis, D. I., & Goodacre, R., Rapid quantification of the adulteration of fresh coconut water by dilution and sugars using Raman spectroscopy and chemometrics, *Food chemistry*, 272, 157-164, **2019**.
- Righetti, L., Rubert, J., Galaverna, G., Hurkova, K., Dall'Asta, C., Hajslova, J., and Stranska-Zachariasova, M., A novel approach based on untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among durum and common wheat, *Food chemistry*, 240, 775-783, **2018**.
- Rinnan, Å., Nørgaard, L., van den Berg, F., Thygesen, J., Bro, R., & Engelsen, S. B., Data pre-processing, *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 29-31, **2009**.
- Ríos-Reina, R., Callejón, R. M., Oliver-Pozo, C., Amigo, J. M., & García-González, D. L., ATR-FTIR as a potential tool for controlling high quality vinegar categories, *Food Control*, 78, 230-237, **2017**.
- Rodríguez, S. D., Rolandelli, G., and Buera, M. P., Detection of quinoa flour adulteration by means of FT-MIR spectroscopy combined with chemometric methods, *Food chemistry*, 274, 392-401, **2019**.
- Rodríguez-Saona, L.E., and Allendorf, M.E., Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food, *Annual review of food science and technology*, 2, 467-483, **2011**.
- Rodríguez-Saona, L., Ayvaz, H., and Wehling, R.L., *Infrared and Raman Spectroscopy*, In *Food Analysis*, Springer, Cham, 107-127, **2017**.
- Romía, M. B., & Bernárdez, M. A., Multivariate calibration for quantitative analysis. In *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 51-82, **2009**.
- Ru, E.C.L., and Etchegoin, P.G. , Chapter 2 - Raman spectroscopy and related optical techniques, in *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, E.C. Le Ru and P.G. Etchegoin, Editors, Elsevier, Amsterdam, 29-120, **2009**.

- Russo, R., Cusano, E., Perissi, A., Ferron, F., Severino, V., Parente, A., and Chambery, A., Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the detection of durum wheat contamination or adulteration, *Journal of mass spectrometry*, 49(12), 1239-1246, **2014**.
- Sádecká, J., & Tóthová, J., Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification-a review, *Czech Journal of Food Sciences*, 25(4), 159-173, **2007**.
- Scanlon, M. G., Sapirstein, H. D., & Bushuk, W., Computerized wheat varietal identification by high-performance liquid chromatography, *Cereal Chem*, 66(5), 439-443, **1989**.
- Schrader, B., General survey of vibrational spectroscopy, *Infrared and Raman Spectroscopy*, Chap.2, VCH Publishers. Inc., New York, USA **1995**.
- Scudiero, L., & Morris, C. F., Field emission scanning electron and atomic force microscopy, and Raman and X-ray photoelectron spectroscopy characterization of near-isogenic soft and hard wheat kernels and corresponding flours, *Journal of Cereal Science*, 52(2), 136-142, **2010**.
- Sharma, K., and Paradakar, M., The melamine adulteration scandal, *Food security*, 2(1), 97-107, **2010**.
- Shenk, J.S., Workman, J.J., and Westerhaus, M.O., Application of NIR spectroscopy to agricultural products. *Practical Spectroscopy Series*, 27, 419-474, **2001**.
- Sikorska, E., Górecki, T., Khmelinskii, I.V., Sikorski, M., and Koziół, J., Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry*, 89(2), 217-225, **2005**.
- Sikorska, E., Khmelinskii, I., & Sikorski, M., Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality* (pp. 491-533), Woodhead Publishing, **2019**.
- Silva, T. V., Hubinger, S. Z., Neto, J. A. G., Milori, D. M. B. P., Ferreira, E. J., & Ferreira, E. C., Potential of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for analyzing the quality of unroasted and ground coffee, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 135, 29-33, **2017**.
- Sissons, M., *Pasta Encyclopedia of Grain Science*, Eds: Wrigley, C. et al., Elsevier Ltd., 410-418, Amsterdam, **2004**.
- Smith, B. C., *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*, CRC press, **2011**.
- Spink, J., and Moyer, D.C., Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), R157-R163, **2011**.
- Subramanian, A., and Rodriguez-Saona, L., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 145-178, **2009**.

- Sujka, K., Koczoń, P., Ceglińska, A., Reder, M., and Ciemniowska-Żytkiewicz, H., The application of FT-IR spectroscopy for quality control of flours obtained from polish producers, *Journal of analytical methods in chemistry*, **2017**.
- Sultanoğlu, P., Hatay İlinde Üretilen Balların Eser Element Düzeyleri ve Kemometrik Yöntemlerle Karakterizasyonu, Mustafa Kemal Üniversitesi, **2011**.
- Taş T., Katışıklı Zeytinyağlarında Katıştırılan Yağ Cinsi ve Oranının FTIR Spektroskopisi ve Kemometrik Yöntemlerle Belirlenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2008**.
- Temiz, H.T., Kemometrik Yaklaşımlarla Gıda Tağışlarının Belirlenmesinde Spektroskopik Yöntemlerin Kullanılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2019**.
- Temiz, H.T., Sezer, B., Berkkan, A., Tamer, U., and Boyacı, I.H., Assessment of laser-induced breakdown spectroscopy as a tool for analysis of butter adulteration, *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 48-54, **2018**.
- Temiz, H. T., Tamer, U., Berkkan, A., & Boyacı, I. H., Synchronous fluorescence spectroscopy for determination of tahini adulteration, *Talanta*, 167, 557-562, **2017**.
- Terzi, V., Malnati, M., Barbanera, M., Stanca, A.M., and Faccioli, P., Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta, *Journal of Cereal Science*, 38(1), 87-94, **2003**.
- Türk Gıda Kodeksi, Makarna Tebliği, Resmi Gazete, No: 2002/ 20, Ankara, Türkiye, **2002**.
- Tarım Ürünleri Sektörü Raporu- Makarna, T.C Ticaret Bakanlığı, Türkiye, **2017**.
- Trullols, E., Ruisanchez, I., & Rius, F. X., Validation of qualitative analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(2), 137-145, **2004**.
- UN.A.F.P.A, Union of Organizations of Manufactures of Pasta Products of the European Union **2015**.
- Uysal, R. S., Boyacı, I. H., Genis, H. E., & Tamer, U., Determination of butter adulteration with margarine using Raman spectroscopy. *Food chemistry*, 141(4), 4397-4403, **2013**.
- Ucuncuoglu, D., Ilaslan, K., Boyacı, I.H., and Özay, D.S., Rapid detection of fat adulteration in bakery products using Raman and near-infrared spectroscopies, *European Food Research and Technology*, 237(5), 703-710, **2013**.
- Xu, L., Yan, S.M., Cai, C.B., Wang, Z.J., and Yu, X.P., The feasibility of using near-infrared spectroscopy and chemometrics for untargeted detection of protein adulteration in yogurt: removing unwanted variations in pure yogurt, *Journal of analytical methods in chemistry*, **2013**.

- Vasquez-Villanueva, R., Dominguez-Vega, E., Montealegre, C., Garcia, M. C., & Marina, M. L., Food Adulterations, In Handbook of Food Analysis-Two Volume Set (pp. 257-288). CRC Press, **2015**.
- Velioğlu, H. M., Temiz, H. T., & Boyacı, I. H., Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis, *Food chemistry*, 172, 283-290, **2015**.
- Wang, J., Kliks, M. M., Jun, S., Jackson, M., & Li, Q. X., Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose, and maltose in honeys from different geographic regions using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis, *Journal of food science*, 75(2), C208-C214, **2010**.
- Wieser, H., Relation between gliadin structure and coeliac toxicity, *Acta Paediatrica*, 85, 3-9, **1996**.
- Wieser, H., Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24(2), 115-119, **2007**.
- Wieser, H., Mödl, A., Seilmeier, W., & Belitz, H. D., High-performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties: amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 185(5), 371-378, **1987**.
- Wise, B. M., Gallagher, N. B., Bro, R., Shaver, J. M., Windig, W., & Koch, R. S., Chemometrics tutorial for PLS_Toolbox and Solo, Eigenvector Research, Inc, 3905, 102-159, **2006**.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130, **2001**.
- Wong, D. M., Bol'shakov, A.A., & Russo, R. E., Laser induced breakdown spectroscopy, 533-538, **2017**.
- Yang, H., and Irudayaraj, J., Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(9), 889, **2001**.
- Yasmin, J., Ahmed, M. R., Lohumi, S., Wakholi, C., Lee, H., Mo, C., and Cho, B. K., Rapid authentication measurement of cinnamon powder using FT-NIR and FT-IR spectroscopic techniques, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(3), 257-267, **2019**.
- Zeković, I., Lenhardt, L., Dramićanin, T., & Dramićanin, M. D., Classification of intact cereal flours by front-face synchronous fluorescence spectroscopy, *Food analytical methods*, 5(5), 1205-1213, **2012**.
- Zhao, H., Guo, B., Wei, Y., and Zhang, B., Near infrared reflectance spectroscopy for determination of the geographical origin of wheat, *Food chemistry*, 138(2-3), 1902-1907, **2013**.

Ziegler, J.U., Leitenberger, M., Longin, C.F.H., Würschum, T., Carle, R., and Schweiggert, R. M., Near-infrared reflectance spectroscopy for the rapid discrimination of kernels and flours of different wheat species, *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, 30-36, **2016**.