

**ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ UNLARDAN FARKLI KOŞULLARDA
ÜRETİLEN EKMEKLERİN BAZI
B VİTAMİNİ İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF VITAMIN B CONTENTS OF BREADS
PRODUCED FROM FORTIFIED FLOURS UNDER
DIFFERENT CONDITIONS**

BERNA BİLGİ BOYACI

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2008

ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ UNLARDAN FARKLI KOŞULLARDA ÜRETİLEN EKMEKLERİN BAZI B VİTAMİNİ İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ

Berna BİLGİ BOYACI

ÖZ

Vitaminler gibi mikrobesein elementi yetersizlikleri toplum sağlığı ile ilgili önemli problemlere neden olmaktadır. Ekmek ülkemizde en yaygın olarak tüketilen gıda olduğundan toplumumuzdaki vitamin yetersizlikleri sorununun çözümünde ilk adım olarak ekmeğin zenginleştirilmesi düşünülmektedir. Bununla beraber, zenginleştirilmiş gıdalardaki vitamin içeriğinin denetlenebilmesi için hassas, güvenilir ve hızlı sonuç veren analiz metotlarının bulunması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin ve folik asiti içeren vitamin karışımı zenginleştirme amacıyla una katılmıştır. Zenginleştirilmiş undan farklı fırın sıcaklıklarında (200, 220, 240°C) ve pişme sürelerinde (20, 25, 30 dk) ekmekler üretilmiştir. Ekmeklerin bazı kalite kriterleri ve L^* , a^* , b^* renk değerleri incelenmiştir. Ekmekler tüm ekmeğin, ekmeğin içi ve ekmeğin kabuğu olarak kısımlara ayrılarak analiz edilmiştir. Ekmek örneklerinde anılan B vitamini miktarlarının HPLC ile tespit edilebilmesi amacıyla çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ve kromatografik yöntemler üzerinde çalışılmış ve her vitamin için en uygun yöntemler belirlenmiştir. Yapılan analizlerde geri kazanım oranları tiamin için % 94, riboflavin için % 95, niasin için % 95, piridoksin için % 89, folik asit için ise % 98 olarak saptanmıştır. Ekmek örneklerindeki tiamin, riboflavin ve niasin miktarları standart AACC metotları ile de belirlenmiştir. HPLC ve AACC metodu sonuçları karşılaştırılmış ve aralarında doğrusal korelasyon (tiamin için $R^2=0.941$, riboflavin için $R^2=0.963$, niasin için $R^2=0.891$) saptanmıştır. Çalışılan proses koşullarında B vitamini kayıplarının en fazla ekmeğin kabuğunda, bunu takiben tüm ekmekte ve en az oranda ekmeğin içinde meydana geldiği görülmüştür. Tüm ekmekte fırın sıcaklığı ve pişme sürelerinin minimum (200°C, 20 dk) ve maksimum (240°C, 30 dk) değerleri arasında tiamin % 16.6, riboflavin % 34.2, niasin % 16.1, piridoksin % 32.8 ve folik asitin %10.1 oranında azaldığı saptanmıştır. Ekmek yapım proses koşulları optimize edilerek minimum vitamin kaybı ile ekmeğin üretilmesi mümkündür. Bununla beraber, bu çalışmada saptanan HPLC analiz yöntemleri ve benzerlerinin yaygınlaştırılarak vitamin katkı ürünlerde denetimlerin çok sıkı yapılması toplum sağlığı açısından bu konunun diğer önemli boyutunu oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: ekmeğin, zenginleştirme, tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin, folik asit, vitamin analizleri, HPLC.

Danışman: Prof. Dr. Süeda ÇELİK, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Bilimleri Anabilim Dalı.

INVESTIGATION OF VITAMIN B CONTENTS OF BREADS PRODUCED FROM FORTIFIED FLOURS UNDER DIFFERENT CONDITIONS

Berna BİLGİ BOYACI

ABSTRACT

The lack of micronutrients such as vitamins leads to serious public health and economic problems. Since bread is the most common food consumed in our country, fortification of bread is considered to be the first step to solve the vitamin deficiency problem. In addition, it is of great importance to have sensitive, reliable and fast analytical methods for determination of vitamins in fortified foods. In this study, a vitamin preparation including thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine and folic acid was added to flour for fortification. Breads were produced using the fortified flour under different oven temperatures (200, 220, 240 °C) and baking time intervals (20, 25, 30 min). Some quality characteristics and L^* , a^* , b^* color values of fortified breads were evaluated. Breads were analyzed after separating in parts as whole, crumb and crust. In order to determine vitamin B contents of fortified breads by HPLC, various extraction and chromatography methods have been studied and the most appropriate methods for each vitamin were determined. The recovery values for thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine and folic acid were determined as 94%, 95%, 95%, 89%, 98%, respectively. Thiamine, riboflavin and niacin contents of breads were also analyzed by AACC methods. The results of HPLC method was compared with that of AACC method and linear correlation between the results ($R^2=0.941$, $R^2=0.963$, $R^2=0.891$ for thiamine, riboflavin and niacin, respectively) was obtained. It was observed that the vitamin loss was greatest in the crust followed by the whole bread and was lowest in the crumb. The amount of vitamin losses that occurred between minimum and maximum values of oven temperature and baking time intervals (200 °C-20 min and 240 °C-30 min) in whole breads for thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine and folic acid were 16.6%, 34.2%, 16.1%, 32.8% and 10.1%, respectively. Breads can be produced with minimum vitamin loss by optimizing the conditions of breadmaking process. In addition to this, it has great importance in terms of public health to have HPLC methods and similar ones become prevalent for controlling the vitamin content of enriched foods strictly.

Keywords: bread, fortification, thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine, folic acid, vitamin analyses, HPLC.

Adviser: Prof. Dr. Seda ÇELİK, Hacettepe University, Food Engineering Department, Food Sciences Division.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi aşamalarında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, değerli görüşlerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Süeda Çelik'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam boyunca olduğu gibi tez çalışma konusunun seçiminde de değerli katkılarıyla yanımda olan hocam Sayın Prof. Dr. Hamit Köksel'e çok teşekkür ederim.

Tez izleme komitesindeki değerli öneri ve katkılarından dolayı sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Dilek Sivri Özay'a çok teşekkür ederim.

"Türkiye'de Yaygın Olarak Tüketilen Hububat Ürünlerinin B Grubu Vitamin İçeriklerinin Araştırılması" isimli proje (Proje No: 2006 K 120 640-06-04) kapsamında tez çalışmama destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatı'na,

"Farklı Üretim Koşullarında Elde Edilen Ekmeklerde HPLC Yöntemi Kullanılarak Tiamin ve Riboflavin Analizi" isimli proje (Proje No: 05 D03 602 001) ve "Bazı Suda Çözünen Vitaminler ile Zenginleştirilen Ekmeklerde Kalite ve Vitamin İçeriklerinin İncelenmesi" isimli proje (Proje No: 06 01 602 001) ile tez çalışmama destek sağlayan H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Çalışmamda kullandığım un örneğini temin eden Ankara Halk Ekmek ve Un Fabrikası A.Ş.'ye,

Vitamin karışımının temin edilmesindeki yardımlarından dolayı DSM Nutritional Products firmasından Cem Köylüoğlu'na,

Ekmek örneklerimin üretiminde laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Deneysel çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Uzman Yelda Zencir ve Uzman Selin Heybeli'ye,

Çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Savaş Bahçeci ve Arş. Gör. Arda Serpen'e,

Destek ve içtenliklerinden dolayı başta Arş. Gör. Özge Çetinkaya Açar ve Arş. Gör. Burçe Ataç olmak üzere bütün bölüm arkadaşlarıma ve personeline,

Sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem Suna Bilgi, babam Yaşar Bilgi ve ağabeyim Ali Fatih Bilgi'ye,

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim, tez çalışmam boyunca da zorlukları aşarken büyük desteğini gördüğüm sevgili eşim Doç. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya,

tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Berna BİLGİ BOYACI

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
EKLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Gıdaların Zenginleştirilmesi	5
2.2. Hububat ve Hububat Ürünlerinin Zenginleştirilmesi.....	10
2.3. Ekmeğin Zenginleştirilmesi Amacıyla Kullanılan Bazı B Grubu Vitaminler	14
2.3.1. Vitamin B ₁ (Tiamin).....	15
2.3.2. Vitamin B ₂ (Riboflavin).....	17
2.3.3. Vitamin B ₃ (Niasin).....	19
2.3.4. Vitamin B ₆ (Piridoksin).....	21
2.3.5. Vitamin B ₉ (Folat, Folasin, Piteroilglutamik asit, Vitamin B ₉).....	23
2.4. Gıdalarda Bulunan Bazı B grubu Vitaminlerin Miktarlarının Tespit Edilmesi .	26
2.4.1. Tiamin Analizleri	32
2.4.2. Riboflavin Analizleri	33
2.4.3. Niasin Analizleri.....	35
2.4.4. Piridoksin Analizleri	36

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa No</u>
2.4.5. Folik Asit Analizleri	37
3. MATERYAL ve METOT	41
3.1. Materyal.....	41
3.2. Kimyasallar ve Diğer Yardımcı Maddeler	41
3.3. Ekipmanlar	41
3.4. Metotlar	42
3.4.1. Un örneğinin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi	42
3.4.1.1. Rutubet miktarı tayini.....	42
3.4.1.2. Protein miktarı tayini	42
3.4.1.3. Kül miktarı tayini	42
3.4.1.4. Yaş gluten miktarı tayini	43
3.4.1.5. Kuru gluten miktarı tayini.....	43
3.4.1.6. Zeleny sedimentasyon testi	43
3.4.1.7. Modifiye sedimentasyon testi	43
3.4.1.8. Farinogram özelliklerinin belirlenmesi.....	43
3.4.2. Un Örneğinin Zenginleştirilmesi.....	43
3.4.3. Ekmek yapma denemesi	44
3.4.4. Ekmek örneklerinin kalite özelliklerinin incelenmesi	45
3.4.4.1. Ekmek hacminin ölçülmesi	45
3.4.4.2. Ekmek örneklerinin renk analizi.....	45
3.4.4.3. Ekmek örneklerinin duyusal değerlendirilmesi.....	45
3.4.4.4. Ekmek örneklerinin vitamin analizleri için hazırlanması	45
3.4.5. B vitaminlerinin analizleri	46

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa No</u>
3.4.5.1. Ekmek örneklerinin tiamin ve riboflavin analizleri	46
3.4.5.2. Niasin analizleri	54
3.4.5.3. Piridoksin analizleri.....	58
3.4.5.4. Folik asit analizleri	60
3.4.5.5. Ekmek örneklerinin B vitamini miktarlarının standart AACC metotları ile belirlenmesi.....	61
3.4.6. Araştırma sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	66
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	67
4.1. Un Örneğinin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Farinogram Özellikleri	67
4.2. Ekmek Örneklerinin Kalite Özelliklerinin İncelenmesi	68
4.2.1. Ekmek örneklerinin renk değerleri	69
4.2.2. Ekmek örneklerinin kalite özellikleri	76
4.3. B Vitaminlerinin Analizleri	78
4.3.1. Ekmek örneklerinde tiamin ve riboflavin analizleri	78
4.3.2. Ekmek örneklerinde niasin analizleri	97
4.3.3. Ekmek örneklerinde piridoksin analizleri.....	105
4.3.4. Ekmek örneklerinde folik asit analizleri.....	113
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	118
6. KAYNAKLAR.....	122
ÖZGEÇMİŞ	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Tiaminin farklı formlarının moleküler yapısı	16
Şekil 2.2. Riboflavinin moleküler yapısı	18
Şekil 2.3. Nikotinik asit, nikotinamid ve nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD) (fosfat) moleküler yapısı.....	20
Şekil 2.4. Vitamin B ₆ vitamerlerinin moleküler yapısı (PN: piridoksin, PNP:piridoksin fosfat, PL: piridoksal, PLP: piridoksal fosfat, PM: piridoksamin, PMP: piridoksamin fosfat).....	23
Şekil 2.5. Folik asitin moleküler yapısı.....	24
Şekil 2.6. Tiokrom reaksiyonu	33
Şekil 3.1. Erbaş et al. (2005)'a göre ekmek örneğinden B vitaminlerinin ekstraksiyonu.....	47
Şekil 3.2. Ndaw et al. (2000) metoduna göre ekmek örneğinden B ₁ ve B ₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu	48
Şekil 3.3. Katı faz ekstraksiyon yöntemi (Cho et al., 2000; Ekinci, 2005).	49
Şekil 3.4. Batifoulier et al. (2005) metoduna göre ekmekten B ₁ ve B ₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu	50
Şekil 3.5. Tiamin ve riboflavinin AACC Metodu No. 86-80 ve 86-70 (AACC, 2000)'ye göre ekmekten ekstraksiyonu.....	51
Şekil 3.6. Finglas and Faulks (1984)'un modifiye edilmiş tiokrom oluşturma metodu	54
Şekil 3.7. Lahély et al. (1999)'a göre gıdalardan niasinin ekstraksiyon metodu ...	55
Şekil 3.8. Rose-Sallin et al. (2001)'e göre gıdalardan niasinin ekstraksiyon metodu	56
Şekil 3.9. Niasin analizinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi.....	57
Şekil 3.10. Bergaentzle et al. (1995) metoduna göre B ₆ vitamininin ekstraksiyonu.	58
Şekil 3.11. B ₆ vitamini analizinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi	60
Şekil 3.12. B ₁ vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-80 (AACC, 2000)'ye göre belirlenmesi.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa No

Şekil 3.13. B ₂ vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-70 (AACC, 2000)'e göre belirlenmesi.....	63
Şekil 3.14. Niasinin belirlenmesindeki 1. aşama: hidroliz (AACC Metodu No. 86-50A).....	64
Şekil 3.15. Niasinin belirlenmesindeki 2. aşama: klarifikasyon (AACC Metodu No. 86-50A).....	65
Şekil 3.16. Niasinin belirlenmesindeki 3. aşama: renk gelişimi (AACC Metodu No. 86-50A).....	65
Şekil 4.1. Buğday ununa ait farinogram.....	68
Şekil 4.2. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmekler (A: İç, B: Kabuk) (Kontrol ekmeği: vitamin katkısız, 220 °C'de 25 dk pişirilmiştir)..	68
Şekil 4.3. Tiaminin kalibrasyon grafiği (1-30 ppm). Mobil faz: İzokratik 50 mM KH ₂ PO ₄ -asetonitril (95:5, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk.....	79
Şekil 4.4. Normal (A) ve zenginleştirilmiş (B) ekmek örneklerindeki tiamin kromatogramı. Mobil faz: İzokratik 50 mM KH ₂ PO ₄ -asetonitril (95:5, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk.	80
Şekil 4.5. Riboflavinin kalibrasyon grafiği (0.02-25.00 ppm). Mobil faz: İzokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 0.5 ml/dk.	81
Şekil 4.6. Normal (A) ve zenginleştirilmiş (B) ekmekteki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: İzokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 0.5 ml/dk..	82
Şekil 4.7. Katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulaması sonucu elde edilen tiamin ve riboflavin kromatogramı. Mobil faz: 25 mM KH ₂ PO ₄ (pH 3.0) (A) ve asetonitril (B) karışımı (gradyent). Akış hızı: 1 ml/dk.....	83
Şekil 4.8. Batifoulie et al (2005) metodundan elde edilen normal ekmek ekstraktına KFE uygulanmadan ve uygulandıktan sonraki tiamin kromatogramı. Mobil faz: 0.05M NaAc-Metanol (30:70; v/v, pH 6). Akış hızı: 1 ml/dk.....	84
Şekil 4.9. Batifoulie et al (2005) metodundan elde edilen normal ekmek ekstraktındaki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: 0.05M NaAc-Metanol (30:70; v/v, pH 6). Akış hızı: 1 ml/dk.	84
Şekil 4.10. Tiaminin kalibrasyon grafiği (0.1-1.0 ppm)	85

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa No

Şekil 4.11. Riboflavinin kalibrasyon grafiği (0.1-0.5 ppm)	85
Şekil 4.12. Finglas and Faulks (1984) yöntemine göre zenginleştirilmiş ekmekteki tiamin kromatogramı. Mobil faz: izokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk. µBondapak C18 ters faz kolonu (3.9 x 300 mm, 10µm)	86
Şekil 4.13. Finglas and Faulks (1984) yöntemine göre zenginleştirilmiş ekmekteki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: izokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk. µBondapak C18 ters faz kolonu (3.9 x 300 mm, 10µm)	86
Şekil 4.14. B ₁ vitamini analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	90
Şekil 4.15. B ₂ vitamini analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	97
Şekil 4.16. Lahély et al. (1999)'a göre elde edilen zenginleştirilmiş ekmekteki nikotinic asit kromatogramı.	98
Şekil 4.17. Nikotinic asitin kalibrasyon grafiği	99
Şekil 4.18. Nikotinamidin kalibrasyon grafiği	99
Şekil 4.19. Zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen nikotinic asit ve nikotinamid kromatogramı	100
Şekil 4.20. Niasin analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	104
Şekil 4.21. B ₆ vitamini standardının kalibrasyon grafiği	106
Şekil 4.22. Bergaenztle et al. (1995) metoduna göre elde edilen ekmek ekstraktının ve piridoksin standartlarının kromatogramı (soldan sağa doğru sırasıyla 1 ppm, 0.6 ppm, 0.2 ppm piridoksin hidroklorid ve normal ekmek ekstraktındaki piridoksin kromatogramı)	106
Şekil 4.23. B ₆ vitamininin kalibrasyon grafiği.....	107
Şekil 4.24. Sodyum borohidrit ile reaksiyonun ve kolon sonrası derivatizasyonun uygulandığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B ₆ standardı kromatogramı	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa No

- Şekil 4.25. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleştiği, kolon sonrası derivatizasyonun uygulanmadığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B₆ standardı kromatogramı.....109
- Şekil 4.26. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleşmediği, kolon sonrası derivatizasyonun uygulandığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B₆ standardı kromatogramı.....109
- Şekil 4.27. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun ve kolon sonrası derivatizasyonun uygulanmadığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B₆ standardı kromatogramı.....110
- Şekil 4.28. Folik asitin kalibrasyon grafiği (0.025-0.500 ppm).....114
- Şekil 4.29. Zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen folik asit kromatogramı114

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Türk Gıda Kodeksinde belirtilen (TGK Tebliğ No. 2002/58, EK2) vitamin ve mineral değerleri	14
Çizelge 2.2. B ₁ ve B ₂ vitamini analizlerinde kullanılan standart metotlar.....	28
Çizelge 2.3. B ₃ , B ₆ vitamini ve folik asit analizlerinde kullanılan standart metotlar.....	29
Çizelge 3.1. Vitamin karışımının içeriği (Miktarlar 1 kg karışım bazında verilmiştir.).....	44
Çizelge 3.2. Mobil faz: 25 mM KH ₂ PO ₄ (A) ve asetonitril (B) karışımı (gradiyent).....	52
Çizelge 3.3. Rose-Sallin et al. (2001) metoduna göre gradiyent ayırımı	56
Çizelge 4.1. Buğday ununa ait kimyasal ve fizikokimyasal özellikler	67
Çizelge 4.2. Un örneğinin farinogram özellikleri	67
Çizelge 4.3. Farklı proses koşullarında üretilen ekmeklerin renk değerleri.....	70
Çizelge 4.4. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin L* renk değeri üzerine etkisi.....	71
Çizelge 4.5. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin L* renk değeri üzerine etkisi.....	72
Çizelge 4.6. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin a* renk değeri üzerine etkisi.....	73
Çizelge 4.7. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin a* renk değeri üzerine etkisi.....	74
Çizelge 4.8. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin b* renk değeri üzerine etkisi.....	76
Çizelge 4.9. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin b* renk değeri üzerine etkisi.....	77
Çizelge 4.10. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerin kalite özellikleri.....	78
Çizelge 4.11. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının tiamin miktarı üzerine etkisi.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 4.12. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin tiamin miktarı üzerine etkisi.....	88
Çizelge 4.13. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen tiamin miktarı	89
Çizelge 4.14. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-80) ile belirlenen tiamin miktarları.....	91
Çizelge 4.15. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının riboflavin miktarı üzerine etkisi.....	93
Çizelge 4.16. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin riboflavin miktarı üzerine etkisi.....	93
Çizelge 4.17. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen riboflavin miktarı	95
Çizelge 4.18. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-70) ile belirlenen riboflavin miktarları	96
Çizelge 4.19. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının niasin miktarı üzerine etkisi.....	101
Çizelge 4.20. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin niasin miktarı üzerine etkisi.....	101
Çizelge 4.21. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen niasin miktarı	102
Çizelge 4.22. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-50A) ile belirlenen niasin miktarları.....	103
Çizelge 4.23. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen piridoksin miktarı.....	111
Çizelge 4.24. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının piridoksin miktarı üzerine etkisi.....	112
Çizelge 4.25. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin piridoksin miktarı üzerine etkisi.....	112
Çizelge 4.26. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen folik asit miktarı.....	115

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa No

Çizelge 4.27. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının folik asit miktarı üzerine etkisi.....	116
Çizelge 4.28. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin folik asit miktarı üzerine etkisi.....	116

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AACC	American Association of Cereal Chemists
ANOVA	Analysis of Variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavin mononükleotid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICC	International Association for Cereal Science and Technology
ICN	International Conference on Nutrition
ILSI	International Life Sciences Institute
KFE	Katı faz ekstraksiyonu
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PAHO	Pan American Health Organization
RDA	Recommended Dietary Allowance
TGK	Türk Gıda Kodeksi
R ²	Korelasyon katsayısı

EKLER DİZİNİ

Sayfa No

EK 1. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmekler (**A:** İç,
B: Kabuk) (Kontrol ekmeği: vitamin katkısız, 220 °C'de 25 dk pişirilmiştir.)..... 131

1. GİRİŞ

Toplumda veya özel risk gruplarında bir veya birkaç besin ögesi yetersizliğinin önlenmesi amacıyla gıdada doğal olarak bulunan veya bulunmayan bir veya daha fazla temel besin ögesinin gıdaya eklenmesi “gıda zenginleştirme” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 1994).

Mikro besin öğeleri olarak tanımlanan vitamin ve minerallerin yetersiz alımı dünyada hem gelişmekte olan hem de endüstrileşmiş ülkelerde toplum sağlığı ve ekonomisi açısından önemli problemlere neden olmaktadır (Fletcher et al., 2004). Besin ögesi yetersizliklerinden en çok etkilenen grupların bebekler, büyüme çağındaki çocuklar, gebe ve emzikli kadınlar olduğu belirtilmektedir (DPT, 2003). Gıdaların zenginleştirilmesinin sağlık üzerindeki genel yararları; yetersiz beslenme sonucu ortaya çıkan anne ve çocuk sağlığı ile ilgili risklerin azaltılması, çocukların büyüme ve gelişimlerinin arttırılması, beslenmeye bağlı körlük, anemi, guatr vb. hastalıkların önlenmesi ve yaşam süresince kronik hastalık riskinin azaltılması şeklinde özetlenebilmektedir.

Vitamin ve mineral eksikliklerinin önlenmesi ve kontrolü için, çözüm önerilerinden birisi de sıklıkla tüketilen gıdaların mikro besin öğelerince zenginleştirilmesidir. Hububat ve hububat ürünleri (buğday unu, pirinç, makarna, kahvaltılık hububat ürünleri vb.) zenginleştirilen ürünler arasında yer almaktadır (FAO, 1995). Ekmek birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de temel olarak tüketilen gıdadır. Toplumumuzda günlük enerji gereksiniminin büyük bölümü ekmekten (% 44) ve ekmek ve diğer hububatlardan (% 58) sağlanmaktadır (Pekcan, 2006). Buğdayın ekmeğe işlenebilmesi için öğütme, fermentasyon ve pişirme gibi çeşitli işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Buğday doğal haldeyken tiamin, riboflavin, niasin, B₆ vitamini, E vitamini, demir ve çinkonun mükemmel bir kaynağıdır. Buğday tanesinde çoğu B vitamini ve mineraller kabuk ve ruşeyimde bulunmaktadır. Öğütme sırasında özellikle tiamin, riboflavin, piridoksin ve folatlar gibi bazı B grubu vitaminleri ve mineraller ayrılan yan ürünlerle undan uzaklaştırılmakta ve unun besinsel bakımdan zayıflamasına neden olmaktadır (Özkaya ve Özkaya, 1999). Bunun yanı sıra ekmek yapma prosesi sırasında pH, sıcaklık, pişme süresi gibi fiziksel faktörler de bazı B

vitaminlerinin (tiamin ve piridoksin gibi) kaybına neden olmaktadır (Batifoulier et. al., 2005). Buğdayda kaybolan vitamin ve minerallerin bir kısmının ekmeğe tekrar kazandırılması ve toplumda yetersizliği görülen besin öğelerinin iyi bir taşıyıcısı olması nedeniyle ekmek zenginleştirilmektedir (Özkaya ve Özkaya, 1992).

Zenginleştirmede günlük vitamin-mineral gereksinimlerinin RDA (Recommended Dietary Allowance) değerlerinin % 25-35'i oranlarında karşılanmasının yeterli olacağı ve değişik ülkelerde de aynı yaklaşımın uygulandığı ifade edilmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Müdürlüğü'nün "Ekmek ve buğday ununun vitamin ve minerallerce zenginleştirilmesi" projesi kapsamında Türkiye'de buğday ununun yukarıda sayılan vitamin ve minerallerle zenginleştirilmesi ile ilgili hazırlık çalışmaları sürdürülmektedir. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 5179 sayılı "Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararname" ile Avrupa Birliği'ne uyum süreci açısından önemli bir adım atılmıştır. Bunların yanında gıda kalitesini ve güvenliğinin sağlanması amacıyla genel kapsamlı veya ürün bazında çok sayıda tebliğler çıkartılmış ve çıkartılmaya devam edilmektedir. Ancak tebliğlerde belirtilen bazı kriterlerin tespit edilmesinde halen problemler yaşanmaktadır. Bu problemlerden birisi de gıdalarda bulunan vitamin miktarının tespit edilmesindeki güçlüklerdir. Zenginleştirilmiş ürünlerdeki suda çözünen vitamin içeriğinin doğru biçimde denetlenmesi ve doğru veri bankalarının kurulması için birinci koşul doğru sonuç veren ve hassas analitik metotların olmasıdır (Blake, 2007).

Gıdalarda bulunan suda çözünen vitaminlerin ölçümleri ile ilgili problemler esas olarak gıdalarda bulunan diğer bileşenler ile girişim yapması ve vitaminlerin bazı gıdalarda düşük miktarda bulunmasından dolayı ölçümünde karşılaşılan zorluklardır (Skurray, 1981). Gıdalardaki vitamin miktarlarının tespiti için hızlı, hassas ve kolay uygulanabilir metotların geliştirilmesinin ve geliştirilen metotların validasyonunun rutin uygulama için oldukça büyük bir rahatlık getireceği düşünülmektedir.

Suda çözünen B grubu vitaminler, çeşitli biyolojik matrikslerde farklı organik formlarda bulunmaktadır (Ollilainen et al., 2001). B grubu vitaminlerin analizlerinin gerçekleştirildiği standart mikrobiyolojik ve florometrik metotlar mevcuttur (AACC, AOAC ve ICC). Fakat günümüzde HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

metotlarının hızı, duyarlılığı, seçiciliği ve tekrar edilebilirliği bunların modern gıda analiz laboratuvarlarında kullanımları için bir tercih nedeni olmaktadır. Bununla beraber, bu metotlarda kromatografik ayırım ve kalibrasyon proseslerini de içine alacak şekilde standardizasyon gereklidir ve çeşitli gıdaları kapsayan daha yeni karşılaştırmalı verilere ihtiyaç duyulmaktadır (Hollman et al. 1993; Olds et al., 1993; Bergaentzle et al., 1995; Eitenmiller and Landen, 1999; Ollilainen et al., 2001). Hububat ürünlerinde de B vitaminleri analizlerinde HPLC'nin kullanıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Normal veya mikrobesein öğelerince zenginleştirilmiş ekmeklerde proses sırasında vitamin miktarlarında meydana gelen değişimler de araştırılmaktadır ve özellikle pişirme sırasında ve farklı ekmek yapma tekniklerinde bazı vitamin miktarlarının değiştiği belirtilmektedir. Bu vitamin miktarlarındaki değişiklikler konusunda da farklı araştırma sonuçları bulunmaktadır. Proses sırasında tiamin miktarında meydana gelen değişimler ekmek yapım yöntemlerine göre değişmektedir. Yapılan bir araştırmada klasik ekmek yapma prosesinde beyaz ekmekte tiamin kaybının % 48 olduğu belirtilmektedir. Uzun fermentasyon süresi tiamin konsantrasyonunu yükseltmiştir. Tam buğday unundan yapılan ekmekte uzun fermentasyon süresi riboflavin oranında % 30 artışa neden olmuştur. Aynı araştırmada tam buğday unundan yapılan ekmekte normal fermentasyonda piridoksin miktarında % 47 kayıp olduğu belirtilmektedir (Batifoulie et al., 2005). Tiamine kıyasla riboflavin ve özellikle de niasinin ekmek yapım koşullarında daha stabil olmalarına rağmen araştırmalar bir miktar kayıp olabileceğini göstermektedir. Zenginleştirme amacı ile ekmeğe katılan vitaminler içerisinde termal stabilitesi en yüksek olan niasindir ve geleneksel yöntemlerle yapılan ekmeklerde niasin kaybının önemsiz olduğu belirtilmektedir (Rubin et al, 1977; Tabekhia and D'appolonia, 1979; Ranhotra and Gelroth, 1986, Özkaya ve Özkaya, 1999). Ülkemizde de farklı koşullarda farklı unlarla üretilen ve zenginleştirilen ekmeklerin B vitamini miktarlarını belirleyen daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Ekmeğin zenginleştirilmesinde kullanılan vitamin ve mineral bileşiklerinin teknolojik uygunlukları ile ilgili çalışmalar renk ve ekmek içi gözenek yapısı gibi ekmeğin bazı

kalite özelliklerinde değişikliklerin meydana gelebileceğini göstermektedir (Cort et al, 1976; Rubin et al, 1977; Özkaya ve Özkaya, 1999).

Bu çalışmada, ekmeğin bazı B grubu vitaminleri ile zenginleştirilmesi; buğday ununa vitamin karışımı ilavesi ve zenginleştirilen bu unlardan ekmek üretimi ile gerçekleştirilmiştir. Buğday ununa zenginleştirme amacıyla tiamin (B₁ vitamini), riboflavin (B₂ vitamini), niasin (B₃ vitamini), piridoksin (B₆ vitamini) ve folik asiti (B₉ vitamini) içeren vitamin karışımı katılmış ve farklı fırın sıcaklıkları (200, 220, 240 C) ve pişme sürelerinde (20, 25, 30 dk) ekmekler üretilmiştir. Farklı proses koşullarının etkilerinin incelenmesi amacıyla ilk olarak ekmek örneklerinin bazı kalite kriterleri (hacim, gözenek yapısı, ekmek içi rengi ve yumuşaklık değerleri) incelenmiştir. Ayrıca ekmek örneklerinin renk değerleri kantitatif olarak saptanması amacıyla spektrofotometrik olarak ölçölmüştür. Bu analizlerden sonra zenginleştirme amacıyla una katılan B vitaminlerinin ekmek örneklerindeki miktarlarının HPLC ile tespit edilebilmesi amacıyla vitaminlerin ekmek matriksinden ekstraksiyonu ve kromatografik olarak belirlenmesi için çeşitli metotlar denenmiştir. Farklı proses koşullarında üretilen ekmek örneklerinin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğu kısımlarında B grubu vitaminlerinin miktarları HPLC yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Tiamin, riboflavin ve niasin vitaminleri HPLC analizlerinin yanı sıra standart AACC yöntemleri ile de belirlenerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıdaların Zenginleştirilmesi

Sağlıklı bir yaşam için besin öğelerinin düzenli olarak alınması gereklidir. Yetersiz beslenme bireylerin ve dolayısı ile genel olarak toplumun sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Mikro besin öğeleri olarak tanımlanan vitamin ve minerallerin yetersiz alımı, özellikle çocuklar, kadınlar ve yaşlılarda anemi, nöral tüp defekti, körlük, guatr gibi çeşitli sağlık sorunlarına ve değişik yaş gruplarındaki çocukların ve doğum sırasında kadınların ölümüne neden olmaktadır. Bireylerin öğrenme yeteneğinde azalma, zihinsel gerilik, enfeksiyon hastalık riskinde artış, düşük çalışma kapasitesi gibi sorunlara yol açmaktadır. Vitamin ve minerallerin yetersiz alımının büyüme, gelişme ve yaşam kalitesi açısından yarattığı olumsuz etkiler ile ülkelerin sosyal ve ekonomik potansiyelinde önemli kayıplar oluşmaktadır.

Birleşmiş Milletler tarafından 2004 yılında yayınlanan raporda (United Nations System Standing Committee on Nutrition, 2004) dünya popülasyonunun yarısından fazlasının yetersiz mikrobesein öğesi tüketmek durumunda kaldığı, bu durumdan da gelişmekte olan ülkelerde okul öncesi dönemdeki çocukların ve kadınların ciddi biçimde etkilendiği belirtilmiştir (Ortiz-Monasterio et al., 2007).

Mikro besin öğeleri yetersizliğinin önlenmesi ve kontrolü için, üç ana strateji ayrı ayrı veya birlikte uygulanabilir. Ayrıca halk sağlığının ve hastalıkların kontrol altına alınması gerekir (FAO/ILSI, 1997). Bu stratejiler:

- Diyetin geliştirilmesi
- Mikro besin öğesi veya öğelerinin doğrudan kullanılması (besin destekleri)
- Sıklıkla tüketilen gıdaların mikro besin öğelerince zenginleştirilmesidir.

Diyetin geliştirilmesi: Risk altındaki kişilerin diyetlerinin vitamin ve minerallerce zengin gıdalardan oluşmasını sağlayacak düzenlemeler yapılmalı, hedef toplumda yanlış beslenme alışkanlıkları değiştirilmelidir. Diyetin geliştirilmesi, etkili bir strateji olmakla birlikte sonuçların alınması çok uzun bir zamanı gerektirmekte ve başta ekonomik nedenler olmak üzere çeşitli nedenlerle her zaman mümkün olamamaktadır.

Beslenme sorunlarının tedavisi ve önlenmesi amacıyla besin desteklerinin kullanılması (suplemantasyon) ve besinlerin zenginleştirilmesi hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Yaşam şeklindeki hızlı değişim ve işlenmiş gıdaların tüketiminde artış nedeniyle, diyeti yeterli kılmak üzere besinler zenginleştirilmektedir.

Diyetin desteklenmesi: Bireye yönelik ve kısa dönem için etkin bir uygulamadır. Diyet destekleyicileri vitamin, mineral, posa, amino asitler, fitokimyasallar, otlar ve botanik ürünleri kapsar.

Gıda zenginleştirme, gıdaların besin ögesi veya ögeleri miktarını arttırarak hedef grupta besin ögesi alımını arttırmak amacıyla yapılan halk sağlığına yönelik bir uygulamadır. Orta ve uzun süreli dönemde etkindir.

Gıdaların besin ögeleri ile zenginleştirilmesi 1940'lı yıllardan bu yana uygulanmaktadır. Gıdaların zenginleştirilmesi amacıyla tiamin, riboflavin, niasin, demir, iyot, A, C ve D vitaminleri kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA (Food and Drug Administration) 1980'li yıllarda gıda zenginleştirme konusunu yasal boyutları ile gündeme getirmiştir (FAO, 1995). Roma'da 1992 yılında yapılan ICN – Uluslararası Beslenme Konferansı'nda (International Conference on Nutrition) gıda ile ilgili aktivitelerin ve gıda zenginleştirmenin vitamin ve mineral yetersizliklerindeki önemi belirtilmiş ve gıda zenginleştirmenin bir zorunluluk olduğu vurgulanmıştır (FAO/WHO, 1992; DPT, 2003).

Gıdalara besin ögelerinin eklenmesini tanımlayan üç terim kullanılmaktadır.

a. Gıda zenginleştirme (Food fortification): Gıdada doğal olarak bulunan veya bulunmayan, bir veya birden fazla elzem besin ögesinin, toplumda veya özel bir risk grubunda bir veya birkaç besin ögesinin yetersizliğinin düzeltilmesi veya önlenmesi amacıyla gıda maddelerine daha fazla miktarda eklenmesidir (FAO/WHO, 1994). Gıdalara besin ögesinin normalde olduğundan fazla miktarda eklenmesi olarak da tanımlanabilmektedir. Örnek olarak A ve D vitamininin süte ve margarine eklenmesi, tuzun iyotlanması (iodization), diş macununun veya musluk suyunun flor ile

zenginleştirilmesi verilebilir (Darnton-Hill and Nalubola, 2002; Poletti et al., 2004; Ranum, 2000).

b. Güçlendirme (enrichment): Gıda zenginleştirme ile eş anlamlı olarak da kullanılmaktadır (FAO/WHO, 1994). Fakat daha çok eklenen besin ögesi, işlem görmemiş gıdada önemli seviyede bulunmakta ve genel olarak proses sırasında kaybolanı bütünleme amacıyla eklenmektedir (Ranum, 2000). Un açısından düşünüldüğünde ise öğütme sırasında kaybolan esansiyel vitamin ve minerallerin orijinal miktarına yakın ölçüde ilave edilmesi olarak tanımlanabilmektedir (Maberly, 2002).

Günümüzde iki sözcük de her iki uygulamayı da ifade etmek için kullanılmaktadır. Ancak zenginleştirme terimi dilimize yerleşmiştir. Bu sözcük tercih edilmektedir.

c. Yerine koyma (restoration): Gıda sanayiinde; üretim, normal depolama ve işleme sürecinde kayba uğrayan elzem besin öğelerinin işlem öncesi düzeyinde eklenmesi, eski içeriğine kavuşturulmasıdır (FAO, 1995).

Hububat ve hububat ürünleri (buğday unu, pirinç, makarna, kahvaltılık hububat ürünleri vb.); süt ve ürünleri; katı ve sıvı yağlar; diğer bazı özel ürünler (tuz, monosodyum glutamat, şeker, soslar vb.); çay ve diğer içecekler, bebek mamaları zenginleştirilen ürünlerdir (FAO,1995; DPT, 2003).

Gıdalara eklenen besin öğeleri çeşitlilik göstermektedir. Hububat ve hububat ürünlerine; B₁ ve B₂ vitamini, niasin, demir ve kalsiyum eklenmesi genel bir uygulamadır. Genellikle iki karışım kullanılmaktadır. Birinci karışımda vitamin A, piridoksin, folik asit, tokoferol asetat, tiamin, riboflavin, niasin ve demir; ikincisinde ise kalsiyum, magnezyum ve çinko kullanılmaktadır. Bu karışım depolamaya dayanıklı bulunmuştur. Hollanda'da ekmeğe iyot da katılmaktadır. Süt ve süt ürünlerine; vitamin A ve D sıklıkla eklenmektedir. Margarinelere vitamin A ve D; sıvı yağlara vitamin A; tuza iyot, demir; monosodyum glutamata vitamin A; şekerde vitamin A; çaya vitamin A eklenmektedir (PAHO/WHO, 1998).

Gıdaların zenginleştirilmesine yönelik bir ortak görüş oluşturulmadığından her ülke kendine özgü uygulamalar yapmaktadır. Fransa, Hollanda, Norveç ve Finlandiya'da

vitamin ve minerallerin gıdalara eklenmesini sınırlayıcı yönetmelikler bulunmaktadır. Fransa'da işleme esnasında kaybolan vitamin kayıplarının % 80-200 oranında yerine konulmasına izin verilmektedir. Yine özel amaçlı diyet ürünlerinin zenginleştirilmesine tüm sayılan ülkelerde olumlu yaklaşılmaktadır. Bu ülkelerde geçmişte görülen beslenme sorunlarının çözülmesinde gıdaların zenginleştirilmesi önemli rol oynamıştır. Gıda zenginleştirme orta ve uzun dönemde çözüm getiren bir stratejidir ve epidemiyolojik çalışmaların her iki üç yılda bir yürütülmesi ve göstergelerin belirlenmesi gerekmektedir (FAO, 1995).

Gıda zenginleştirmede gözönüne alınması gereken genel ilkeler vardır. Bunlar:

1. Risk altındaki toplum tarafından zenginleştirilecek gıdanın tüketiliyor olması,
2. Tüketildiğinde yetersizliği belirlenen sorunu düzeltebilmesi veya önleyebilmesi,
3. Zenginleştirilen gıdanın tüketici tarafından kabullenilmesi,
4. Gıdada istenmedik değişikliklerin oluşmaması (renk, tat, görünüş, yapı, pişirilme özellikleri), raf ömrünün kısaltılmaması,
5. Tüketiminin güvenli olması, risk grubu tarafından gıdanın fazla tüketimi ile aşırı alımının olmaması (toksik etki göstermemesi),
6. Elzem besin öğesinin normal koşullarda paketleme, depolama, dağıtım ve kullanım sırasında kayba uğramaması,
7. Maliyetinin uygun olması,
8. Teknolojisi ve işleme olanaklarının uygun olması,
9. Tüketiciyi yanıltıcı olmaması,
10. Denetim ve izleme yöntemlerinin olması,
11. Gıda standartları, yönetmelikleri ve besin öğesinin eklenme ilkelerinin belirlenmesidir (FAO, 1994; Ranum, 2000).

Gıda zenginleştirmede başarıyı etkileyen etmenler ise:

1. Öncelikle sorunun tanımlanması,
2. Politika yapıcılarının ve halkın ilgi ve desteğinin sağlanması,
3. Üreticilerin kesin desteği ve katılımının sağlanması,
4. Etkin kalite kontrolü, paketlenme ve dağıtım sisteminin oluşturulması,
5. Üreticiye ekonomik ve pazarlama desteğinin sağlanması,
6. Biyoyararlılığı yüksek bileşiklerin seçilmesi,
7. Yasal düzenlemelerin ve yönetmeliklerin yürürlüğe sokulması ve zorlayıcı olmasıdır.

Gıda zenginleştirme uygulamalarında yeterli ve dengeli beslenmeyi sağlamak amacıyla halkın eğitilmesi, bilinçlendirilmesi ve etiket üzerinde bilgilendirmenin yer alması büyük önem taşımaktadır (DPT, 2003).

Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda zenginleştirme programı düzenlenerek hükümet tarafından zorunlu hale getirilmiştir. Bu program, toplumun genelinin diyetlerinde eksik olabilecek gerekli olan temel besin öğelerini yeterli miktarda alması için oluşturulmuş bir halk sağlığı programıdır. Gıdalara besin öğelerinin eklenmesi gıda kaynağının besleyici kalitesini arttırmada etkili bir yol olarak görünüyor olmasına karşın, düzenleme olmadan yapılan zenginleştirme problemlere neden olabilmektedir. Bazı gıdalar gerekenden fazla seviyede zenginleştirme ile besin öğesi dengesizliklerine neden olabilirler. Bunun düzenlenmesi için besin öğeleri gıdalara eklenirken dikkat edilmesi gereken durumlar FDA tarafından aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (Ranum, 2000).

1. Bilinen bir besinsel eksikliğin düzeltilmesi,
2. Proses sırasında kaybolan besin öğelerinin yenilenmesi,
3. Kalori içeriği ile besleyici öğe içeriğinin dengelenmesi,
4. Geleneksel gıdaların yerini alan yeni ürünlerde besleyici değer düşmesinden kaçınılması,

5. Diğer program ve düzenlenmelerle uyumlu olunması.

Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Venezuela, Şili ve Britanya Krallığı gibi bazı ülkeler hububat zenginleştirme programına sahip iken bundan en büyük faydayı sağlayacak olan gelişmekte olan ülkelerde bu programın bulunmaması üzüntü verici bir durumdur (Ranum, 2000). Avrupa Birliği'ndeki tüketicilerin güvenliğinin sağlanması için gıdaların vitaminler ve minerallerle zenginleştirilmesi konusunda düzenlemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok mikrobesein ögesi için yeterli alım seviyesi ile maksimum alım seviyesi arasında az bir fark bulunmaktadır. Bu nedenle yapılan bir araştırmada, genel olarak toplumda kolay zarar görebilecek gelir düzeyi düşük gruplarda fazla miktarda tüketim riskini önlemek için zenginleştirilmiş gıdaların toplam mikrobesein ögesi alımı üzerine etkisinin tahmin edilmesi amacıyla bir modele ihtiyaç bulunduğu belirtilmiştir (Rasmussen et al., 2006). Benzer şekilde, zenginleştirmenin toplumun bütününde güvenli olması ve bütün kaynaklardan kabul edilemeyecek düzeyde yüksek miktarlarda mikrobesein elementi tüketiminin önlenmesi amacıyla maksimum güvenli zenginleştirme seviyelerinin belirlenmesi için Hollanda'da da risk değerlendirme modelinin geliştirilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır (Kloosterman et al., 2007).

2.2. Hububat ve Hububat Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

Hububat ve hububat ürünleri tüm dünyada ve ülkemizde insan besini olarak kullanılan en yaygın ürünlerdir ve özellikle vitamin, mineral ve bazı amino asitlerin önemli kaynaklarıdır. Fakat hububat ve ürünleri genel olarak düşük miktarlarda mikrobesein elementi içermektedir ve bunların büyük bölümü gıda veya yem prosesleri sırasında kayba uğramaktadır (Cheng and Hardy, 2003; Poletti et al., 2004).

Ekmek birçok ülkede temel olarak tüketilen gıdadır (Tabekhia and D'appolonia, 1979). Türk halkının beslenme durumuna bakıldığında da temel gıdanın ekmek ve diğer hububat ürünleri olduğu görülmektedir. Buğdayın ekmeğe işlenebilmesi için öğütme, fermentasyon ve pişirme gibi çeşitli işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Buğday doğal haldeyken tiamin, riboflavin, niasin, B₆ vitamini, E vitamini, demir ve çinkonun mükemmel bir kaynağıdır. Buğday tanesinde vitamin ve minerallerin kabuk ve ruşeyimde yoğunlaşmış olması ve öğütme sırasında ayrılan yan ürünlerle bunların

undan uzaklaştırılması unun besinsel bakımdan zayıflamasına neden olmaktadır. Bu nedenle ekmeğin besin değerinin artırılması veya en azından proses sırasında buğdayda kaybolan bazı besin öğelerinin ekmeğe tekrar kazandırılması için birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle beslenme yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların yaygın olduğu ülkelerde ekmeğin besinsel değerinin daha da önem kazandığı görülmektedir (Pomeranz and Shellenberger, 1971; Pomeranz, 1988; Özkaya ve Özkaya, 1992; Özkaya ve Özkaya, 1999; Pekcan, 2006).

Hububat ürünleri dünyada genellikle tüm ülkelerin temel gıdası olmaları nedeniyle sıklıkla zenginleştirilen ürünlerdir. Hububatın zenginleştirilmesinin çok düşük bir maliyet ile bir ulusun besinsel sağlığını iyileştirmede etkili bir yol olduğu belirtilmektedir (Ranum, 2000). Devlet İstatistik Enstitüsü 1994 Yılı Hanehalkı Tüketim Harcamaları ve Gelir Dağılımı Araştırması sonuçlarına dayanılarak yapılan çalışmalar sonucunda verilen bölgesel gıda tüketimi analizi sonuçlarına göre Türkiye geneline bakıldığında, tahıl ve tahıl ürünlerinin tüketimi ilk sırada yer almaktadır (DPT, 2003). Dünyada ortalama günlük enerjinin % 50'si hububattan sağlanmaktadır. Türkiye'de de günlük enerjinin % 44'ü ekmekten, % 58'i ise ekmek ve diğer hububatlardan gelmektedir (Pekcan, 2006).

Un ve ekmeğin vitaminlerle zenginleştirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar ilk olarak bazı değirmencilerin una D vitamini katması ile 1920'li yıllarda başlamıştır. Otuzlu yılların başlarında beyaz unda B vitamini kaybının azaltılması ile ilgili çalışmalar yürütülmüş, sonlarında ise sentetik tiaminin ticari olarak elde edilebilmesinin ardından tiamin katılımının olanakları araştırılmıştır. 1941 yılında un ve ekmek tiamin, niasin, riboflavin ve demir ile zenginleştirilerek savaşta gıda olarak kullanılmıştır (Rubin et al., 1977).

Günümüzde birçok ülkede ekmeğin mineral ve vitaminlerce zenginleştirilmesi zorunlu hale getirilmiştir. Böylece beslenme yetersizliklerine bağlı olarak ortaya çıkan bazı hastalıklarda önemli azalmalar tespit edilmiştir. Unun zenginleştirilmesinde daha önceden hazırlanmış mikrobesein öğeleri karışımı kullanılmaktadır. Her ülke una eklenecek vitamin ve minerallerle ilgili kendi standardına sahiptir. Birçok ülkede Un Zenginleştirme programında mimimum olarak folik asit ve demir bulunmaktadır. Diğer mikrobesein öğeleri ise toplumun beslenme durumuna, un ürünlerinin tüketim

şablonuna ve hazırlama metotlarına, diğer zenginleştirme potansiyeline sahip gıdaların uygunluğuna göre eklenebilmektedir (Maberly, 2002).

Ülkemizde de vitamin ve mineraller gibi mikrobesein ögesi yetersizlikleri sorunu önemli bir halk sağlığı problemidir. Bu yetersizliklerin önlenmesine ilişkin öneriler Ulusal Gıda ve Beslenme Eylem Planı'nda yer almaktadır. Hububat ürünleri, ülkemizde en fazla tüketilen gıda maddeleri arasında önemli bir yere sahiptir ve toplumumuzdaki mikrobesein ögesi yetersizlikleri sorununun çözümü için bu ürünlerin vitamin ve mineral içeriklerinin hangi sınırlar arasında değiştiğinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sınırlar belirlendikten sonra eksiklikler ile ilgili daha sağlıklı çözüm önerileri yapılabilecektir.

Ülkemizde vitamin ve mineral yetersizliğini ve buna bağlı olarak meydana gelen hastalıkları ortaya koyan ulusal düzeyde veriler bulunmamaktadır. Bununla birlikte sınırlı sayıda bazı araştırmalar yapılmıştır. Türkiye'de 0-5 yaş grubu çocuklarda; büyüme ve gelişme geriliği, demir yetersizliği anemisi, raşitizm, okul çağı çocuk ve gençlerde; zayıflık ve şişmanlık, demir yetersizliği anemisi, vitamin yetersizlikleri, iyot yetersizliği hastalıkları, diş çürükleri, yetişkin kadınlarda; zayıflık ve şişmanlık, demir yetersizliği anemisi, iyot yetersizliği hastalıkları, vitamin yetersizlikleri, yaşlılarda; beslenmeye bağlı kronik hastalıklar sık görülmektedir (Pekcan, 1998). Folat yetersizliğine bağlı nöral tüp defekti prevalansı 10 bin doğumda 30.1 olarak bulunmuştur Bu sorun da 15-49 yaş grubu kadınlar için önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir (Tunçbilek et al, 1999).

Ülkemizde vitamin ve mineral yetersizliğinin önlenmesinde en çok tüketilen gıda maddesi olan ekmeğin zenginleştirilmesinin gerekli olduğu ifade edilmektedir. Bu amaçla ekmeğin/ekmeklik unun vitamin ve minerallerle zenginleştirilmesinde B₁, B₂, B₆, B₁₂, C vitaminleri, niasin, folik asit, demir, kalsiyum ve çinkonun öncelikli olarak kullanılacak besin öğeleri olduğu belirtilmektedir. B₁ vitamini ve niasin yönünden yetersizliğin toplumumuzda yaygın olmamakla beraber enerji metabolizmasındaki kullanımları nedeniyle zenginleştirme kapsamına alınması gerektiği de vurgulanmaktadır (Wertherit et al, 1992; Açkurt et al, 1995; Pekcan, 2006).

Zenginleştirmede günlük vitamin-mineral gereksinimlerinin RDA (Recommended Dietary Allowance) değerlerinin % 25-35'i oranlarında karşılanmasının yeterli olacağı ve değişik ülkelerde de aynı yaklaşımın uygulandığı ifade edilmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Müdürlüğü'nün "Ekmek ve buğday ununun vitamin ve minerallerce zenginleştirilmesi" projesi kapsamında Türkiye'de buğday ununun yukarıda sayılan vitamin ve minerallerle zenginleştirilmesi hazırlık çalışmaları sürdürülmektedir. İlgili kuruluşlar bu uygulamanın gerekli alt yapı oluştuktan sonra tüm ülkede zorunlu hale getirilmesini amaçlamaktadır. Ekmeğin zenginleştirilmesinde hangi besin öğeleriyle ne oranda zenginleştirileceği, zenginleştirilmiş ekmeğin biyoyararlılığı, ekmeğe katılan vitamin ve minerallerin üretim prosesinde yaratacağı problemler, zenginleştirilmiş un ve ekmekte vitamin ve mineral analizleri gibi konunun çeşitli boyutlarının ülkemiz koşullarına göre ele alınması gerekmektedir.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 5179 sayılı "*Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararname*" ile Avrupa Birliği'ne uyum süreci açısından önemli bir adım atılmıştır. Bunların yanında gıda kalitesini ve güvenliğini sağlamak amacıyla genel kapsamlı veya ürün bazında çok sayıda tebliğler çıkartılmış ve "Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği", "Makarna Tebliği", "Sporcu Gıdaları Tebliği", "Bebek Mamaları - Bebek Formülleri Tebliği" gibi tebliğler çıkartılmaya devam edilmektedir.

Türk Gıda Kodeksinde belirtilen (TGK Tebliğ No. 2002/58, EK2) beslenme referans değerleri ve unda ve ekmekte bulunması gereken alt ve üst limit değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Hesaplamalar 68 gram undan 100 gram ekmek üretimi esas alınarak yapılmıştır.

Gıda kalite ve güvenliğini ortaya koymak ve tüketicinin doğru olarak bilgilendirilmesini sağlamak amacıyla; tüketiciye sunulan ürünlerin tebliğlerde belirtilen kriterleri taşıyıp taşımadığının ve ürünlerin etiket bilgilerinin doğruluğunun Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın ilgili laboratuvarlarında analizler ile ortaya konulması gerekmektedir. Ancak tebliğlerde belirtilen bazı kriterlerin tespit edilmesinde halen problemler

Çizelge 2.1. Türk Gıda Kodeksinde belirtilen (TGK Tebliğ No. 2002/58, EK2) vitamin ve mineral değerleri.

Vitaminler ve Mineraller	A	B	C	D	E
B ₁ vitamini (mg/100g)	1.4	0.51	0.72	0.35	0.49
B ₂ vitamini (mg/100g)	1.6	0.59	0.82	0.40	0.56
B ₆ vitamini (mg/100g)	2	0.74	1.03	0.50	0.70
B ₁₂ vitamini (mcg/100g)	1	0.37	0.51	0.25	0.35
Niasin (mg/100g)	18	6.62	9.26	4.50	6.30
Folik asit (mcg/100g)	200	73.50	102.90	50.00	70.00
Demir (mg/100g)	14	5.15	7.21	3.50	4.90
Kalsiyum (mg/100g)	800	294	412	200	280
Çinko (mg/100g)	15	5.51	7.72	3.75	5.25

A: Beslenme referans değerleri (TGK Tebliğ No. 2002/58, EK2)

B: 100 gram unda hedeflenen alt limit

C: 100 gram unda hedeflenen üst limit

D: 100 gram ekmekte hedeflenen alt limit

E: 100 gram ekmekte hedeflenen üst limit

yaşanmaktadır. Bu problemlerden birisi de gıdalarda bulunan vitamin miktarının tespit edilmesindeki güçlüklerdir. Vitamin tabletlerinde ve yemlerde bulunan vitaminlerin tespiti gıda maddelerine göre daha kolay olmaktadır. Gıda maddelerindeki vitamin miktarının tespiti için hızlı, hassas ve kolay metotların geliştirilmesi, geliştirilen metotların valide edilmesi rutin uygulama için oldukça büyük bir rahatlık getirecektir.

2.3. Ekmeğin Zenginleştirilmesi Amacıyla Kullanılan Bazı B Grubu Vitaminler

Gıda zenginleştirme amacıyla kullanılan vitaminler organizmada önemli fonksiyonlara sahiptirler. Vitaminler enerji kaynağı olmamalarına rağmen, yağ ve karbohidratların enerjiye dönüşümüne yardımcı olmakta ve kemik ve doku oluşumunu desteklemektedirler (Ötleş and Karaibrahimoglu, 2005). Çeşitli B grubu vitaminleri, organizmada enerji üretmek için gıdaların katabolizmasında fonksiyonu olan enzimlerin koenzimi olarak görev yapmaktadır. Koenzimin vitamin kısmı genellikle

enzimin substrata bağlanmasından sorumludur. Koenzimi oluşturacak olan spesifik vitamin ortamda bulunmadığında metabolik proses içerisindeki kimyasal değişikliklerin sırası ilerlememekte ve değişimi bloke olmuş olan ürün dokularda birikmektedir. Alternatif olarak metabolizma başka bir metabolik yola yön değiştirebilmektedir (Ball, 2006).

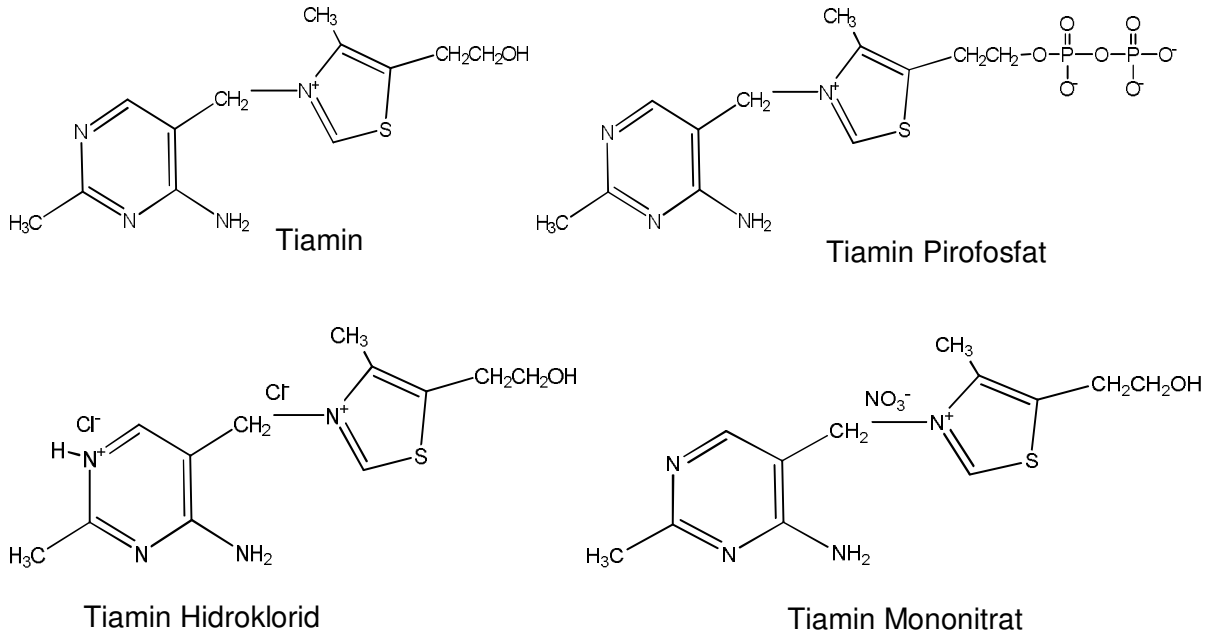
Ekmeklerin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılan bazı B kompleksi vitaminleri, bunların özellikleri ve organizma için önemleri aşağıda belirtilmiştir.

2.3.1. Vitamin B₁ (Tiamin)

Tiamin 1926 yılında yapısal olarak ilk karakterize edilen suda çözünen vitamindir. Bir molekül pirimidinin metil köprüsü ile bir molekül tiyazol grubuna bağlanması ile oluşmuştur. Pirimidin halkasında bir NH₂ (amino grubu), tiyazol halkasında çok aktif bir N vardır. Pirimidin ve tiyazol halkalarını bağlayan metilen köprüsü oldukça zayıftır. Özellikle alkali çözeltide ısıtılırsa bu köprü kopar ve vitamin özelliğini yitirir (Çelik, 2006). Doğal olarak; serbest halde ve tiamin monofosfat, tiamin difosfat (veya tiamin pirofosfat) ve tiamin trifosfat şeklinde bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bütün formları bitki ve hayvan dokularında bulunmakla birlikte bitki dokuları hayvan dokularına göre daha fazla serbest tiamin formunu içermektedir. Tiamin metabolizmada tiamin pirofosfat şeklinde etkinlik göstermektedir. Tiamin pirofosfat normal karbonhidrat, nükleik asit ve amino asit metabolizması için gerekli olduğundan merkezi bir rol oynamaktadır. TCA döngüsündeki piruvattan asetil koenzimA sentezinde piruvat dehidrojenaz kompleksi tarafından karakterize edilen alfa-keto asitlerin dekarboksilasyonundaki temel kofaktörlerden birisidir. Tiamin pirofosfat ve diğer tiamin fosfat esterleri sinir impulsları iletiminde görev almaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006). Tiaminin koenzim olarak makro besin öğelerinin oksidasyonunda ve adenosin trifosfat üretiminde rol aldığı belirtilmiştir (Hanninen et al., 2006).

Tiamin ışık ve oksidasyona karşı nispeten stabil olmasına rağmen suda çözünen vitaminler arasında nötr pH değerinde en düşük stabiliteye sahip olan vitaminlerdendir. Alkali pH değerlerinde ise stabil değildir. pH 2.0-4.0 arasında maksimum stabiliteye sahipken düşük asitliğe sahip gıdalarda ısı işlemi ile kayıplar meydana gelebilmektedir (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999).

Tiamin ticari olarak hidroklorid ve mononitrat tuzları şeklinde bulunmaktadır. Bu formları gıdaların zenginleştirilmesinde ve besin desteklerinde yaygın olarak



Şekil 2.1. Tiaminin farklı formlarının moleküler yapısı.

kullanılmaktadır. Tiamin hidrokloridin (1 g/ml), mononitrat formuna (0.027 g/ml) göre daha fazla çözünürlüğe sahip olması sıvı gıdaların zenginleştirilmesinde kullanımı açısından avantajdır. Fakat aktivasyon enerjilerindeki farktan dolayı tiamin mononitrat 95°C'nin altında daha stabil iken tiamin hidroklorid 95-110°C'den yüksek sıcaklıklarda daha stabildir (Gregory, 1996).

Tiamin yetersizliği, sinir ve sindirim sistemi bozuklukları şeklinde ortaya çıkmaktadır. Tiamin yetersizliğinin temel formu olan beriberi hastalığı ilk olarak 20. yüzyıldan önce kabuksuz pirinçle beslenen Uzak Doğu ülkelerinde yaygın olarak görülmüş ve pirincin zenginleştirilmesi ile büyük ölçüde ortadan kaldırılmıştır. Uzun süre düşük tiamin alımı sonucunda ortaya çıkan Beriberi hastalığı kuru beriberi, yaş beriberi ve çocuk beriberi olarak üç farklı formda bulunmaktadır. Kuru beriberi; iştahsızlık, yorgunluk, periferik sinir iltihabı semptomları gösterirken yaş beriberi beden faaliyetlerinde düzensizlik, kas güçsüzlüğü, ödem ve kalp zayıflığına neden olmaktadır. Kusma, katılma, karın şişkinliği, iştahsızlık ile karakterize edilen çocuk beriberisi ise hızlı şekilde kalbin

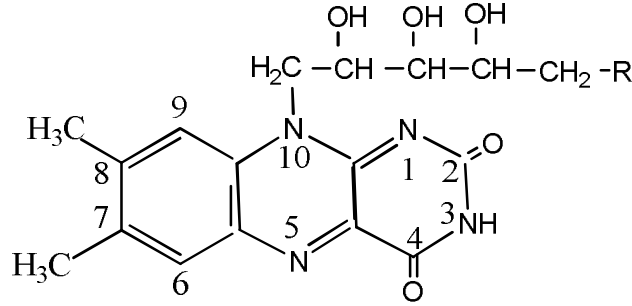
durması ile sonuçlanabilmekte, öldücü olabilmektedir. Şiddetli tiamin eksikliği olarak tanımlanan Wernicke-Korsakoff's sendromu ise halüsinasyon, karıştırma, akıl hastalığını içeren zihinsel bozukluklar ve koma ile karakterize edilmektedir. Bu hastalığa çoğunlukla gıda almadan uzun süre alkol kullanan kişilerde rastlanılmaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999; Lynch and Young, 2000; Baysal, 2002; Ball, 2006).

2.3.2. Vitamin B₂ (Riboflavin)

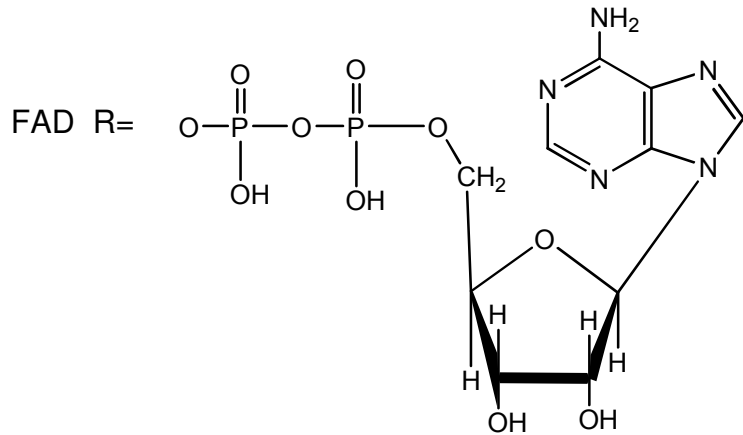
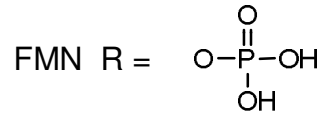
Riboflavin ilk olarak 1932 yılında hücre solunumunda fonksiyonu olan sarı renkli enzim olarak bira mayasından izole edilmiştir. Riboflavinin yapısı 1933 ile 1935 yılları arasında belirlenmiş ve sentezlenmiştir. Riboflavin ismi yapısındaki beş karbonlu basit karbonhidrat olan riboz ve sarı renkli pigment olan flavin gruplarından gelmektedir. Riboflavin 7,8-dimetil-10(1'-ribitil) izoalloksozin yapısındadır (Şekil 2.2). Ribitil yan zincirinin 5' pozisyonunun fosforilasyonu ile flavin mononükleotid (FMN), 5'-adenozil monofosfat birim ilavesi ile de flavin adenin dinükleotid (FAD) meydana gelmektedir. FMN ve FAD çeşitli oksidasyon-redüksiyon proseslerini katalizleyen flavine bağlı çok sayıda enzimin koenzimi olarak görev yapmaktadır. Bir molekülden diğer moleküle hidrojen taşınmasında görev almaktadırlar. Flavine koenzimleri, B₆ vitamini ve folat vitamenerinin kendi içlerinde birbirlerine dönüşümlerindeki spesifik reaksiyonları ve triptofandan NAD sentezi için gereklidir. Koenzimler FMN ve FAD, gıdalarda ve sindirim sisteminde bulunan fosfataz enzimlerinin aktivitesi sonucunda riboflavin formuna dönüşmektedir. Bunun yanı sıra, ribitil yan zinciri ile izoalloksozin arasındaki karbon-azot bağının asit hidrolizine dayanıklı olmasına rağmen pH 5.0'ın altında FMN ve FAD'nin kolaylıkla riboflavine dönüştüğü belirtilmektedir. Bu nedenle toplam riboflavin miktarının belirlendiği analitik proseslerde asit hidrolizine birinci aşama olarak yer verilmektedir (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006). Gıdalarda riboflavin serbest halde bulunabildiği gibi proteine bağlı FAD ve FMN formunda da bulunmaktadır (Ball, 2006).

Riboflavin seyreltilmiş hidroklorik asit ve alkali ortamlarda çözünmektedir. Suda 10–13 mg/100 ml, mutlak etanolde 4.5 mg/100 ml çözünürlüğe sahipken aseton, dietileter ve kloroformda çözünmemektedir (Ball, 2006).

Riboflavin, FMN ve FAD ışığa karşı çok duyarlıdır. Riboflavin ışıktan korunduğu takdirde ısı ve oksidasyona karşı stabildir. Bu nedenle birçok gıdaya uygulanan işlemler riboflavin içeriği üzerinde az etki göstermektedir. Riboflavin asidik ortamda en



Riboflavin R = OH



Şekil 2.2. Riboflavinin moleküler yapısı.

fazla stabiliteye sahipken nötral pH'da stabilitesi azalmakta, alkali ortamda ise degradasyona uğramaktadır. FMN ve FAD pH 5.0'ın altında riboflavine dönüşmekte ve pH 7.0'ın üzerinde isoalloxazine halkası tahrip olmaktadır. Fotokimyasal reaksiyon asidik veya nötral solusyonlarda gerçekleştiğinde ribitil yan zinciri kırılmakta ve lumikrom oluşmaktadır. Alkali ortamda ise ribitil yan zincirinin deoksi-ucu karbonunda meydana gelen kırılma ile lumiflavin meydana gelmektedir. Lumiflavin riboflavine göre

daha kuvvetli floresan özellik gösterdiğinden kromatografik analiz ile flavin belirlenmesinde lumiflavin reaksiyonu önemli bir analitik araçtır (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999).

Hububat taneleri düşük konsantrasyonlarda flavin içermelerine rağmen hububatın temel gıda olduğu ülkelerde önemli kaynak teşkil etmektedirler (Ball, 2006). Riboflavinin çoğunluğu ruşeym ve kepek kısmında bulunduğundan öğütme ile önemli miktarda kayıp meydana gelmektedir (Rivlin, 1975). Öğütme işlemi ile % 60'a kadar kayıp meydana geldiğinden unun riboflavin ile zenginleştirilmesi ile ekmek ve tüketime hazır kahvaltılık hububat ürünlerine katkıda bulunulabilmektedir (Ball, 2006).

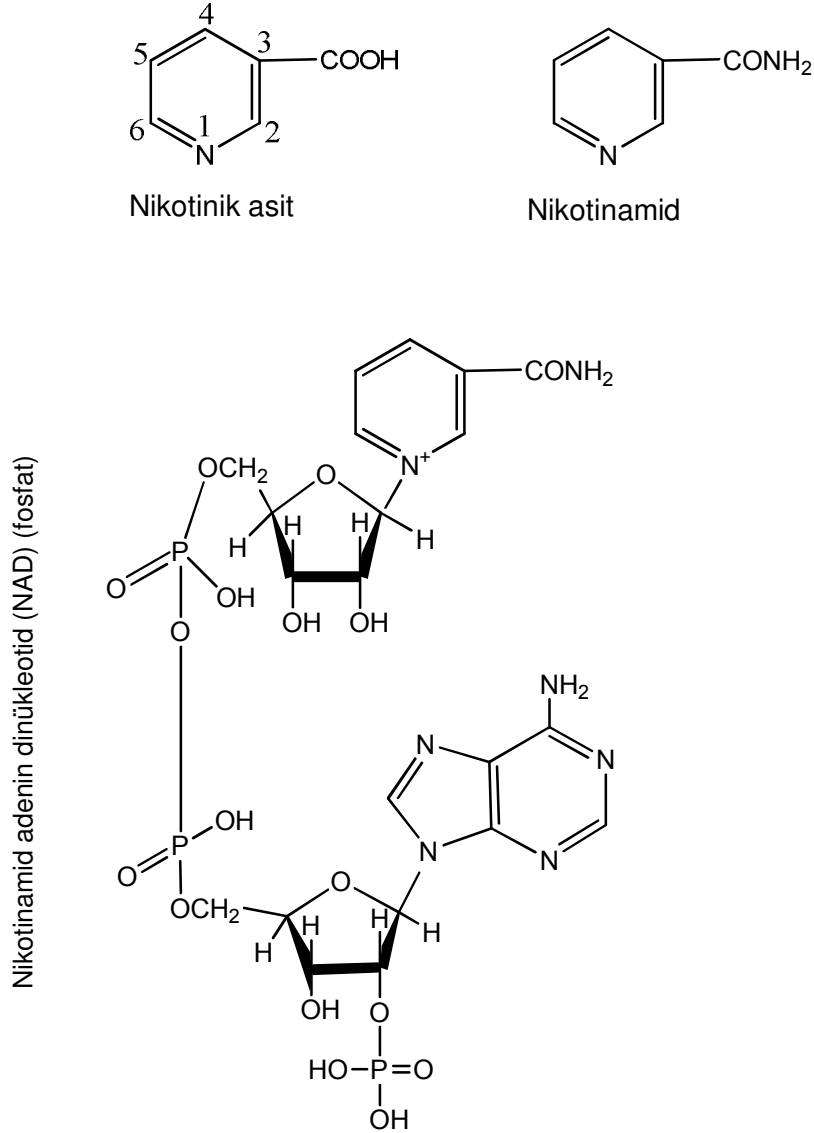
Riboflavin yetersizliği genellikle diğer suda çözünen vitamin yetersizlikleriyle beraber meydana gelmektedir. Riboflavin metabolizmasının folik asit, niasin ve vitamin B₆ metabolizmasıyla olan yakın ilişkisi birbiriyle bağlantılı olan yetersizlik semptomları veya diğer besinlere ihtiyaç duyan metabolik sistemlerin düzensiz çalışması ile sonuçlanmaktadır. Riboflavin eksikliğinde deride, özellikle dudak, burun ve göz kenarlarında yaralar görülmektedir. Bunların yanısıra görme zorluğu, göz damarlarında genişleme, yanma ve sinir sistemi bozuklukları da yetersizlik belirtilerindedir (Eitenmiller and Landen, 1999; Baysal, 2002).

2.3.3. Vitamin B₃ (Niasin)

Niasin, benzer vitamin aktivitesi gösteren pridin 3-karboksilik asit (nikotinik asit) ve türevleri için kullanılan genel terimdir (Şekil 2.3). Suda çözünen nikotinik asit ve amid formu olan nikotinamid (pridin 3-karboksilik asit amid) insanlar için önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Mawatari et al., 1991). Asit ve amid formları birbirine dönüşebilmektedir. Niasinin koenzim formları olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) birçok dehidrogenaz reaksiyonunda yer almaktadır (Gregory, 1996).

Nikotinamidin sudaki çözünürlüğü (100 g/100ml) nikotinik aside göre (1.67 g/100ml) daha fazladır. Suda çözünen vitaminlerin en stabili olan niasin ışıktan etkilenmemektedir. Pişirme işlemlerinde birbirlerine dönüşümleri nedeniyle belli niasin bileşenlerinin konsantrasyonu değişebilmektedir. Örnek olarak mısırın kaynatılması

sırasında NAD ve NADP'den ısı etkisiyle serbest nikotinamidin açığa çıkması verilebilir. Asit veya alkali koşullarda uygulanan ısı işlem ile nikotinamid, vitamin aktivitesinde herhangi bir kayba uğramadan nikotinic aside dönüşmektedir. Bunların yanısıra, bir ürün içerisindeki niasin bileşenlerinin dağılımı çeşide ve olgunlaşma



Şekil 2.3. Nikotinic asit, nikotinamid ve nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD) (fosfat) moleküler yapısı.

safhasına göre çeşitlilik göstermektedir. Stabilesinden dolayı asit ve alkali hidrolizi ile biyolojik örneklerden ekstrakte edilebilmekte ve bu sayede niasin koenzim yapısından serbest hale geçmekte ve örnek matriksi parçalanmaktadır. Gıda proseslerinin

yürütüldüğü koşullarda termal etkiyle kayba uğramamaktadır (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999). Niasin gıdalarda serbest ve bağlı formlarda bulunmaktadır. Hububatlarda bulunan niasin genel olarak polisakkaritlere, polipeptid ve glukopeptidlere bağlı formdadır.

Niasin yetersizliği insanlarda pellegra hastalığına neden olmaktadır. İlk olarak hastalığın mısırdaki bulunan toksik elementlerden veya enfeksiyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmüş, fakat daha sonra 1920 yılında Goldberger tarafından bu hastalığın bulaşıcı olmadığı ve mısırdaki bir besleyici faktörün yokluğu nedeniyle oluşabileceği gösterilmiştir. Bu faktör 'pellegrayı önleyici faktör' olarak adlandırılmıştır. Goldberger ve arkadaşları yoğunlaştırılmış maya ile pellegrayı iyileştirmişlerdir. Mayalar niasin yönünden zengin olduğundan mayalı ekmeğe göre daha fazla niasin sağlamaktadır. Öğütme sırasında kepek ve embriyonun ayrılması ile tahılların niasin değeri azaldığından saflaştırma işlemi sonrasında bazı ülkelerde niasin ile zenginleştirilmektedir. Pellegra, 3-D hastalığı denilen dermatoz, demans ve ishal semptomlarını içermektedir. Pellegra; mısır ve diğer hububat ürünlerinin temel hammadde olduğu bölgelerde problem olmaya devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki alkoliklerin gelişen pellegra riski altında olduğu belirtilmektedir (Eitenmiller and Landen, 1999). Ülkemizde halk çoğunluğunun diyetinde kuru baklagiller ve bulgur çok yer tuttuğundan pellegra hastalığı ender görülmektedir (Baysal, 2002). Yüksek protein içeren gıdalarda triptofanın nikotinamide metabolik dönüşümü nedeniyle besinsel niasine olan ihtiyaç azalmaktadır. Canlılarda vücuda alınan 60 mg triptofandan 1 mg niasin elde edilmektedir (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006).

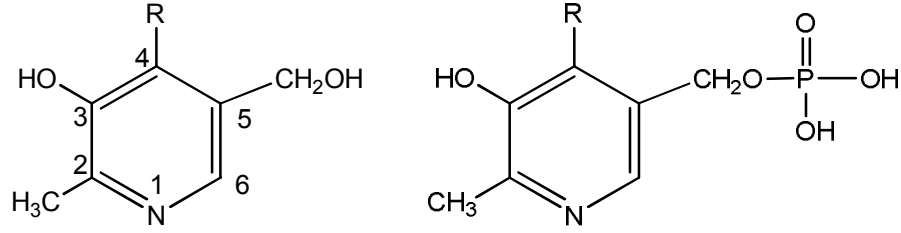
2.3.4. Vitamin B₆ (Piridoksin)

B₆ vitamini, ilk kez 1934 yılında Paul György tarafından laboratuvar hayvanlarının büyümesi ve bazı deri lezyonlarının iyileşmesi için gerekli bir vitamin olarak açıklanmıştır. 1938 yılında Lepkovsky ve arkadaşları tarafından yiyeceklerden kristaller halinde ayrılmış ve bir yıl sonra vitaminin sentezi yapılmıştır. Marjinal vitamin B₆ eksikliği genellikle diğer besin eksiklikleriyle bağlantılı olmakla birlikte genel olarak halsizlik, uykusuzluk, sinir sistemi bozuklukları, iştahsızlık, büyüme de yavaşlama ve

çeşitli dermatolojik bozukluklar şeklinde semptomlar göstermektedir (Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006). Protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasındaki yüzden fazla enzimde anahtar koenzim rolü oynamasından dolayı B₆ vitamininin yeterli miktarda tüketimi gereklidir (Sampson et al., 1995).

B₆ vitamini, piridoksin vitamin aktivitesine sahip olan 2-metil-3-hidroksil-5-hidroksimetilpiridin bileşenleri için kullanılan genel terimdir. B₆ vitamininin çeşitli formları 4-pozisyonundaki bir-karbon yerini alan grubun yapısına göre farklılık göstermektedir (Gregory, 1996; Sierra and Vidal-Verde, 1997; Eitenmiller and Landen, 1999; Viñas et al., 2004). Bu grup; piridoksinin yapısında alkol, piridoksalda aldehid, piridoksaminde ise amindir (Şekil 2.4). Bu üç temel form pridoksal kinaz tarafından 5'-hidroksimetil gurubunda fosforlaştırılarak piridoksin 5'-fosfat, piridoksal 5'-fosfat, piridoksamin 5'-fosfat şekline de dönüşebilmektedir. Piridoksin, piridoksal ve piridoksamin metabolik olarak birbirlerine dönüşebilmektedir (Morrison and Driskell, 1985). Her üç öğenin eşit oranda vitamin B₆ etkinliği gösterdiği ortaya konulmuştur. B₆ vitamininin piridoksal 5'-fosfat ve daha az ölçüde piridoksamin 5'-fosfat formları; aminoasit, karbonhidrat, sinirsel iletim (neurotransmitter) ve lipidlerin metabolizmasında yer alan yüzden fazla enzimatik reaksiyonda anahtar koenzim olarak görev yapmaktadırlar (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999; Gatti and Gioia, 2005).

B₆ vitamini gıdalarda doğal olarak piridoksin, piridoksal, piridoksamin ve bunların 5'-fosfat formları şeklinde bulunmaktadır. Bunlara ilaveten bitkisel kaynaklı gıdalarda (hububat, meyve ve sebzelerde) piridoksinin glukozid formlarından piridoksin-5'-β-D-glukozid önemli ölçüde yer almaktadır. Bu bileşik β-glukosidaz veya takadiastaz enzimi ile piridoksine dönüşebilmektedir (Sampson et al., 1995; Gregory, 1996; Bognâr ve Ollilainen, 1997; Sierra and Vidal-Verde, 1997; Kall, 2003).



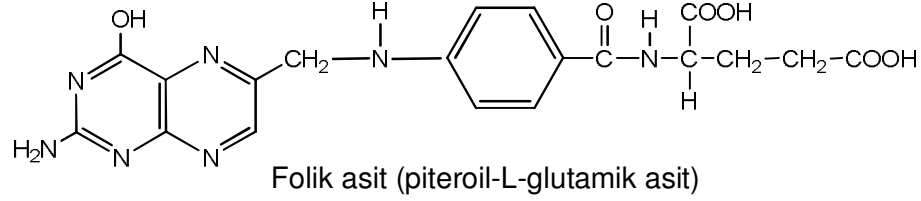
<u>Yan Zincir (R)</u>	<u>Vitamerler</u>
CH ₂ OH	PN, PNP
CHO	PL, PLP
CH ₂ NH ₂	PM, PMP

Şekil 2.4. Vitamin B₆ vitamerlerinin moleküler yapısı (PN: piridoksin, PNP: piridoksin fosfat, PL: piridoksal, PLP: piridoksal fosfat, PM: piridoksamin, PMP: piridoksamin fosfat).

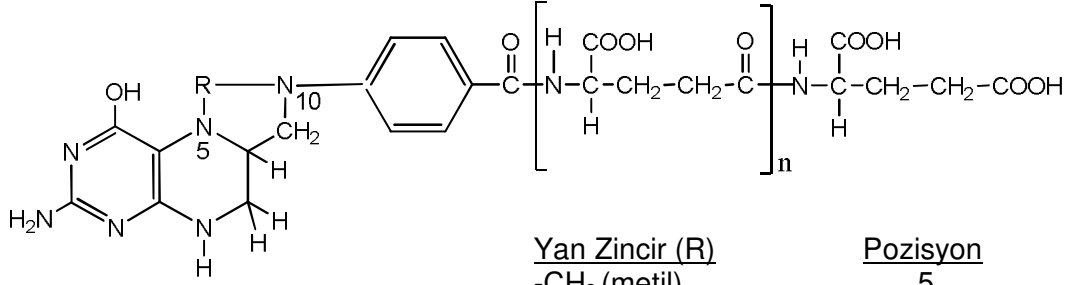
B₆ vitamini ışığa karşı duyarlıdır. Işıktan korunduğunda bütün formları asidik koşullarda stabildir. Piridoksin; piridoksal ve piridoksamine göre daha stabildir. Piridoksin hidroklorid stabilitesinin iyi olmasından dolayı gıdaların zenginleştirilmesinde ve ek besinlerde ticari olarak kullanılan vitamin B₆ formudur. Suda (22 g/100 ml), alkol ve propilen glikolde ise kolaylıkla çözünmektedir (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999).

2.3.5. Folik asit (Folat, Folasin, Piteroilglutamik asit, Vitamin B₉)

Folik asit, başlıca üç organik maddenin birleşmesinden meydana gelir. Bunlar pteridin, p-aminobenzoik asit (PABA) ve glutamik asittir. Folik asitin p-aminobenzoik asit ve pteridin'den oluşan kısmına pteroiik asit de denilir. Bu nedenle folik asit, Piteroil-L-glutamik asit olarak da adlandırılır. Folik asitin çeşitli sayıda glutamik asit kapsayan türevleri vardır. Karaciğerde bulunan bir folik asit derivesi bir glutamik asit kapsar (Piteroilmonoglutamik asit) (Şekil 2.5). Folasin terimi biyolojik olarak aktif folik asit için kullanılırken folat terimi bu grup vitaminlerin genel adıdır (Çelik, 2006).



Poliglutamil tetrahidrofolatlar



<u>Yan Zincir (R)</u>	<u>Pozisyon</u>
-CH ₃ (metil)	5
-CHO (formil)	5 veya 10
-CH=NH (formimino)	5
-CH ₂ (metilen)	5 ve 10
-CH= (metinil)	5 ve 10

Şekil 2.5. Folik asitin moleküler yapısı.

Gıdalarda doğal olarak bulunan folatların çoğunluğunu poliglutamatlar olarak 5-metiltetrahidrofolat, 5-formilterahidrofolat, 10-formilfolat, 10-formildihidrofolat, terahidrofolat oluşturmaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999; Ruggeri et al., 1999; Phillips et al., 2006). Genel olarak gıdalardaki folatların yaklaşık % 80'inin poliglutamil formunda olduğu varsayılmaktadır (Gregory, 1996).

Gıdaların zenginleştirilmesinde folatların folik asit formu kullanılmaktadır. Folik asit doğal olarak bulunan folatların az bir bölümünü oluşturmasına rağmen kimyasal degradasyona karşı daha yüksek stabiliteye sahip olması, elde edilebilirliği ve biyoyararışlılığı nedeniyle gıdaların zenginleştirilmesi ve vitamin karışımlarının hazırlanmasında kullanım sebebidir (Gregory, 1989; Eitenmiller and Landen, 1999; Dang et al., 2000; Arcot et al, 2002). Folik asit doğada kayda değer miktarlarda bulunmamasına rağmen vücutta sindirilebilmekte ve aktif kofaktör formlarına dönüşmektedir (Devi et al, 2008). Folatlar; DNA, RNA ve protein bileşenlerinin sentezindeki birçok tek karbon transfer reaksiyonlarında esansiyel koenzimler olarak

görev yaparak insan beslenmesinde önemli rol oynamaktadır (White, 1990; Eitenmiller and Landen, 1999; Ruggeri et al., 1999; Devi et al, 2008).

Folat eksikliğinin hamilelik döneminde nöral tüp defekti (sipina bifida) riskini ve koroner kalp hastalığı, Alzheimer hastalığı ve belirli tümör formlarının oluşumu riskini arttırdığına dair gün geçtikçe artan bulgular mevcuttur. Bunların yanısıra yeterli folat alımının tromboembolitik prosesler ve nöropsikiyatrik bozukluk riskinin azalmasında da önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (Freisleben et al., 2003; Phillips et al., 2006). Folik asidin gebelik öncesinde ve gebeliğin ilk 8 haftası boyunca yetersiz miktarda alımı sonucu nöral tüp defektlerine sahip bebeklerin doğumu artmaktadır. Folat eksikliğinin her sene dünyaya gelen yüzotuz milyon bebekten üçyüzellibin tanesinde spina bifida gibi ciddi doğum kusurlarına neden olduğu, fakat bununla beraber sentetik folik asit tüketimi ile bu oranın büyük ölçüde önlenildiği bildirilmiştir (Maberly, 2002). Çeşitli araştırmalar sonucunda yetersiz folat tüketen insanların kan homosistein düzeyinin yüksek olduğu, bunun da koroner kalp hastalığı ve yaşla bağlantılı bazı hastalıklar için risk oluşturduğu bildirilmiştir. Folat alımının artırılması ile kardiyovaskular hastalıkların riski de azalmaktadır (Finglas et al., 1999; Ruggeri et al., 1999; Kariluoto et al., 2001; Arcot et al., 2002; Baysal, 2002). Yakın zaman içerisinde folatların antioksidan aktivitesinin belirtildiği çalışmalar da literatürde yer almıştır (Joshi et al., 2001; Gliszczyńska-Swigło, 2007).

FDA tarafından 1996 yılında yayınlanan, 1998 yılında etkin hale gelen düzenleme ile bütün zenginleştirilmiş hububat ürünlerinin (un, pirinç, ekmek, makarna, mısır gevreği, irmik, noodle vb.) folik asit ile 140 µg/100g oranında zenginleştirilmesi zorunlu hale getirilmiştir. Bunun başlıca nedeni nöral tüp defektinin oluş sıklığının folat alımı ile azalması, ikinci nedeni ise kardiyovasküler hastalık ve belirli kanser tiplerinin görülmesindeki azalma olarak belirtilmiştir. Zenginleştirme sonucunda doğumlarda nöral tüp defekti sıklığının % 19 oranında azaldığı belirtilmiştir. Ondokuz-elli yaşlardaki bayanlarda hamileliğin ilk ayında nöral tüp defekti sıklığının azaltılması için RDI (Referans günlük alım) miktarının 400 µg/100g'a artırılması tavsiye edilmektedir (Neuhausser and Beresford, 2001; Gujska and Majewska, 2005; Póo-Prieto et al., 2006).

2.4. Gıdalarda Bulunan Bazı B grubu Vitaminlerinin Miktarlarının Tespit Edilmesi

Vitaminler insan metabolizmasının normal fonksiyonu için çok az miktarlarda gerekli olan bir grup organik bileşiktir. Çeşitli kimyasal ve fizyolojik fonksiyona sahip olan vitaminler doğal gıda kaynaklarında geniş bir dağılım göstermektedirler. İnsan beslenmesinde kabul edilen on üç adet vitamin bulunmaktadır ve çözünlüklerine göre iki grupta sınıflandırılırlar. Yağda çözünen vitaminler A, D, E, K vitamini ve elliden fazla farklı derecelerde A vitamini aktivitesine sahip olan karotenoidleri içermektedir. Suda çözünen vitaminler ise C vitamini ve B grubu vitaminleri kapsamaktadır. B grubu vitaminler; tiamin (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), niasin (vitamin B₃), vitamin B₆, biotin, pantotenik asit, folik asit ve vitamin B₁₂ 'dir (Ötleş and Karaibrahimoglu, 2005; Ball, 2006).

Zenginleştirilmiş ürünlerdeki suda çözünen vitamin içeriğinin doğru biçimde denetlenmesi ve doğru veri bankalarının kurulması için birinci koşul doğru ve hassas analitik metotların olmasıdır (Blake, 2007). Benzer şekilde Avrupa Birliği'nin gıda etiketleme direktiflerinin karşılanması, beslenme ve sağlık ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar için detaylı gıda kompozisyonu verilerinin üretilmesi ve uygulanan proseslerin vitamin stabilitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gıdalarda bulunan vitaminlerin tespit edilmesi için kesin doğru olan metotların kullanılmasının bir gereklilik olduğunun belirtildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Finglas et al. 1996; van den Berg et al., 1996).

Gıdalarda bulunan suda çözünen vitaminlerin ölçümleri ile ilgili problemler esas olarak gıdalarda bulunan diğer bileşenler ile girişim yapması ve vitaminlerin bazı gıdalarda düşük miktarda bulunmasından dolayı ölçümünde karşılaşılan zorluklardır (Skurray, 1981). Gıdalarda bulunan vitaminlerin tespiti için, özellikle farklı gıda matrislerine uygulanabilen güvenilir ve düzenli olarak validasyonu yapılan analiz tekniklerinin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Finglas, 1993).

Suda çözünen B grubu vitaminler, çeşitli biyolojik matrislerde farklı organik formlarda bulunmaktadır (Ollilainen, 2001). B grubu vitaminlerin analizinde mikrobiyolojik, florimetrik ve kolorimetrik yöntemleri esas alan standart AACC, AOAC ve ICC analiz

metotları mevcuttur (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3). Yirmibeş yıldan fazla zamandır kullanılan mikrobiyolojik yöntemler vitamin aktivitesine biyolojik tepki verdiğiinden senelerdir 'altın standart' olarak anılmaktadır. Fakat resmi prosedürleri genellikle iyi tanımlanmamıştır ve günümüzdeki laboratuvar koşullarını tam olarak yansıtmamaktadır. Bunun yanısıra farklı vitamerlerin gelişme özellikleri arasında farklılıklar bulunabilmektedir. Birçok suda çözünen vitaminin standart yöntemlerle analizinde kullanılan florimetrik ve kalorimetrik metotlar da günümüz şartlarına uymamaktadır (Blake, 2007). Fakat günümüzde sıvı kromatografisi metotlarının hızı, duyarlılığı, seçiciliği, oldukça başarılı tekrar edilebilirliği bunların modern gıda analiz laboratuvarlarında kullanımları için bir tercih nedeni olmaktadır. Bununla beraber, bu metotlarda kromatografik ayırım ve kalibrasyon proseslerini de içine alacak şekilde metotların standardizasyonu gereklidir ve çeşitli gıdaları kapsayan daha yeni karşılaştırmalı verilere ihtiyaç duyulmaktadır (Rizzolo and Polesello, 1992; Olds et al, 1993; Hollman et al. 1993; Bergaentzle et al., 1995; Eitenmiller and Landen, 1999; Ollilainen et al., 2001). Fakat hububat ürünlerinde B vitaminleri analizlerinde HPLC'nin kullanıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır.

HPLC ile yapılan analizlerde kullanılacak olan kromatografik yöntemin seçilmesi; uygulanan ekstraksiyon ve temizleme prosedürlerine ve ölçümü yapılacak olan vitaminlere bağlıdır. Suda çözünen vitaminlerin analizinde kullanılan kromatografik yöntemler; normal ve ters faz kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, iyon exclusion kromatografisi ve ters faz iyon çifti kromatografisidir (Ball, 2006).

İyon değiştirme kromatografisinde örnek iyonlarının ayırımı, örnek kolondan geçerken meydana gelen çok sayıdaki sorpsiyon-desorpsiyon döngülerindeki seçiciliğe bağlıdır. Fonksiyonel gruplar için yüksek afiniteye sahip olan iyonlar kolonda tutulurken, sadece zayıf biçimde birbirlerini etkileyen iyonlar yarışan iyonlarla kolaylıkla yer değiştirmekte ve kolondan erken ayrılmaktadır (Ball, 2006).

Çizelge 2.2. B₁ ve B₂ vitamini analizlerinde kullanılan standart metotlar.

Vitamin	Standart Metot (No)	Ölçüm Yöntemi	Örnek Çeşidi
Vitamin B₁ (tiamin)	AOAC No. 942.23	Florometrik	Gıdalar
	AOAC No. 953.17	Florometrik	Hububat ürünleri
	AOAC No. 957.17	Florometrik	Ekmek
	AOAC No. 986.27	Florometrik	Süt bazlı bebe mamaları
	AACC No. 86-80	Florometrik	Ekmek ve diğer hububat ürünleri, un, irmik, mısır irmiği, mısır kırmacı, patlatılmış hububat ürünleri
	ICC No. 117	Florometrik	Hububat ürünleri
	ICC No. 119	Florometrik	Zenginleştirilmiş un ve karışımlar
Vitamin B₂ (riboflavin)	AOAC No. 940.33	Mikrobiyolojik	Vitamin karışımları
	AOAC No. 960.46	Mikrobiyolojik	-
	AOAC No. 970.65	Florometrik	Gıdalar ve vitamin karışımları
	AOAC No. 985.31	Florometrik	Tüketime hazır süt bazlı bebe mamaları
	AACC No. 86-70	Florometrik	Hububat, tüketime hazır süt bazlı bebe mamaları, irmik, kırma, patlamış hububat ürünleri, irmik ve ekmek
	AACC No. 86-72	Mikrobiyolojik	Hububat, tüketime hazır süt bazlı bebe mamaları, irmik, kırma, pulcuk haline getirilmiş ve patlatılmış hububat ürünleri, irmik ve ekmek
	AACC No. 86-90	HPLC	Vitamin konsantratları

Çizelge 2.3. B₃, B₆ vitamini ve folik asit analizlerinde kullanılan standart metotlar.

Vitamin	Standart Metot (No)	Ölçüm Yöntemi	Örnek Çeşidi
Vitamin B₃ (niasin)	AOAC No.944.13	Mikrobiyolojik	Vitamin karışımları
	AOAC No.961.14	Kolorimetrik	İlaçlar, gıdalar, yemler
	AOAC No. 975.41	Otomatik, Kolorimetrik	Hububat ürünleri
	AOAC No. 981.16	Otomatik, Kolorimetrik	Gıdalar, ilaçlar, yemler
	AOAC No. 968.32	Spektrofotometrik	Vitamin karışımları
	AOAC No. 985.34	Mikrobiyolojik	Tüketime hazır süt bazlı bebe mamaları
	AACC No. 86-49	Kolorimetrik	Zenginleştirilmiş konsantratlar
	AACC No. 86-50A	Kolorimetrik	Hububat ürünleri
	AACC No. 86-51	Mikrobiyolojik	Hububat ürünleri
	AACC No. 86-90	HPLC	Vitamin konsantratları
ICC standard No. 111	Spektrofotometrik	Hububat ve hububat ürünleri, un, nişasta ürünleri	
ICC standard No. 112	Mikrobiyolojik	Hububat taneleri, un, hububat ve nişasta ürünleri	
Vitamin B₆	AOAC No. 961.15	Mikrobiyolojik	Gıda ekstraktları
	AOAC No. 985.32	Mikrobiyolojik	Tüketime hazır süt bazlı bebe mamaları
	AACC No. 86-31	Mikrobiyolojik	Hububat ürünleri
	AACC No. 86-90	HPLC	Vitamin konsantratları
Folik asit	AOAC No. 944.12	Mikrobiyolojik	Vitamin karışımları
	AOAC No. 992.05	Mikrobiyolojik	Bebe mamaları
	AACC No. 86-47 (toplam folat)	Mikrobiyolojik	Hububat ürünleri

Kullanılan diğer bir yöntem olan iyon exclusion kromatografisinde, iyonik molekülleri iyonik olmayan veya zayıf iyonik özelliğe sahip olan moleküllerden ayırmak amacıyla iyon değiştirme reçinesi kullanılmaktadır. Destek maddesinin fonksiyonel gruplarıyla aynı yüke sahip olan iyonlar, değiştirici-çözelti ara yüzeyindeki elektrik potansiyeli tarafından uzaklaştırılmaktadır ve sulu fazdan reçine tanelerinin gözeneklerinden uzaklaştırılmaktadırlar. İyonik olmayan veya zayıf iyonik özellikteki moleküller

uzaklaştırılmamakta, yeteri kadar küçük olmaları halinde kolaylıkla matris içine difüzlenebilmektedirler. Diğer bir ifadeyle, iyonize olan örnek kolondan hızlı biçimde geçerken iyonik olmayan veya zayıf iyonik maddeler daha yavaş geçmektedir (Ball, 2006).

Ters faz kromatografisinde ise örneğin iyonik dengesi, pK_a değerlerine göre bileşenlerin alıkonması veya ayrılmasının sağlanması için mobil fazın pH'sı ayarlanarak kontrol altına alınmaktadır. Bir zayıf asit için pK_a değerinin 1-2 birim altına veya zayıf bir baz için pK_b değerinin aynı miktarda üzerine mobil fazın tamponlanması ile iyonlaşma bastırılmakta ve sabit faza daha fazla afiniteye sahip olan ayrışmamış bileşik kolonda alıkonmaktadır. Bu nedenle zayıf asitler pH 2-5, zayıf bazlar ise pH 7-8 bölgesinde alıkonabilmektedir (Ball, 2006).

Ters faz iyon çifti kromatografisinde, geleneksel ters faz kromatografisinde kullanılan aynı tipteki kolon dolgu maddesi ve su/organik mobil fazlar kullanılmaktadır. Mobil fazın pH değeri, çözünen maddenin iyonlaşmasını sağlamak için ayarlanmakta ve analitinkine zıt yüke sahip olan amfifilik iyon çifti ajanı mobil faza eklenerek kolonda alıkonması kontrol edilmektedir. Suda çözünen vitaminler için yapılan uygulamalarda 5 veya 10 μm 'lik silika bazlı C_{18} dolgu maddesi kullanılmaktadır. İyonik ve iyonik olmayan madde karışımlarının ayrılmasındaki genel yaklaşım, optimum alıkonma süresi ve iyonik olmayan maddelerin ayrılmasını sağlamak için organik çözücünün (genellikle metanol) miktarının (%) ayarlanmasıdır. Daha sonra iyonik bileşenlerin izokratik olarak ayrılması için uygun olan iyon çifti ajanı kimyasalı eklenmektedir (Ball, 2006).

Suda çözünen vitaminlerin gıdalarda belirlenmesi için UV ve floresan dedektörlü HPLC kullanılmaktadır. UV dedektörlü HPLC ile özellikle zenginleştirilmemiş gıdalarda az miktarda vitamin bulunduğundan genellikle yeterli hassasiyet ve spesiflik elde edilememektedir. Floresan dedektörlü sıvı kromatografisi ise vitaminin doğal floresansını kullanarak veya uygun floresan özellikte bir kompleks oluşturmak için derivatizasyon ile daha iyi hassasiyet ve spesiflik sağlayabilmektedir (Finglas, 1993). Floresan dedektör kullanımı ile girişim yapan maddelerin aralığı da azalmaktadır (Wimalasiri and Wills, 1985). Bunun yanısıra HPLC metotları farklı

vitaminlerin aynı anda belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999; Esteve et al., 2001). Tiamin ve riboflavini birlikte aynı zamanda elverişli biçimde tayin edilebildiği için bu iki vitamini aynı ekstraktan analiz edebilen metotlar bulunmaktadır (Mauro and Wetzel, 1984; Finglas and Faulks, 1984; Wimalasiri and Wills, 1985; Arella et al., 1996; Marshall et al., 1997; van den Berg et al., 1996; Ndaw et al., 2000; Esteve et al., 2001; Ollilainen et al., 2001).

HPLC ile yapılan analizlerde bazı durumlarda daha uygun dedeksiyonun ve/veya daha uygun bir kromatografik modun kullanımının kolaylaştırılması için analizi yapılan analitin kimyasal türevinin oluşturulması gerekmektedir. Türevlendirme işlemi analitin türevlendirilmesinin gerekliliğine göre analit HPLC kolonuna girmeden önce veya kolondan çıktıktan sonra uygulanabilmektedir. Kolon öncesi türevlendirmede reaksiyon HPLC tarafından analiz edilmeden önce gerçekleştirilmektedir. Kolon sonrası türevlendirmede ise, analizi yapılacak solusyon kolondan geçtikten sonra ayrılan bileşikler ile türevlendirici madde karıştırıcı T ve dedektör arasına yerleştirilen ısıtılmış reaksiyon halkasında reaksiyona girmektedir. Kolon sonrası türevlendirme sistemi türevlendirici maddenin sisteme dahil edilebilmesi için ikinci bir pompaya ihtiyaç duymaktadır. Bu durum HPLC kolonu ile dedektör arasındaki mesafenin artması nedeniyle kaçınılmaz olarak piklerde biraz genişlemeye neden olmaktadır. Bunun yanısıra madde içerisindeki safsızlıkların veya fazla bileşenlerin ayrılma veya ortamdaki uzaklaştırılma imkanı bulunmadığından dedektörün hassasiyeti azalabilmektedir. Kolon öncesi türevlendirme işlemi ise el ile (manuel) yapıldığından daha fazla beceri gerektirmekte ve standardize olmamış koşullarda gerçekleşmektedir. Avantajı ise reaksiyon karışımının enjeksiyon öncesinde temizlenmesi ve daha basit ve verimli bir kromatografik sistem ile çalışılmasıdır (Ball, 2006).

Ekmeğin zenginleştirilmesi uygulamalarında proses sırasında katılan vitamin miktarlarında meydana gelen değişimler de araştırılmaktadır ve özellikle pişirme sırasında bazı vitamin kayıpları olduğu belirlenmiştir. Bu vitamin kayıpları konusunda da farklı araştırma sonuçları bulunmaktadır. Proses sırasında tiamin miktarında meydana gelen değişimler ekmeğin yapım yöntemlerine göre değişmektedir (Özkaya

ve Özkaya, 1999). Rubin et al. (1977) sponge dough yöntemini kullanarak yaptıkları zenginleştirilmiş ekmeğin örneklerinde pişme işlemi ile tiamin, riboflavin ve niasin miktarının değişmediğini saptamışlardır. Tabekhia and D'appolonia (1979) ise çalışmalarında geleneksel ve sürekli yöntemle yapılan ekmeklerdeki vitamin içeriklerini karşılaştırmışlar ve geleneksel yöntem ile tiamin kaybının daha fazla olduğunu, riboflavin ve niasin miktarlarında ise değişim olmadığını saptamışlardır.

Ranhotra and Gelroth (1986) ekmeğin zenginleştirilmesinde kullandıkları tiamin, riboflavin ve niasinin stabilitesini incelediklerin çalışmalarında iyi stabiliteye sahip oldukları sonucuna varmışlardır. Tiamine kıyasla riboflavin ve özellikle de niasinin ekmeğin yapım koşullarında daha stabil olmalarına rağmen araştırmalar bir miktar kayıp olabileceğini göstermektedir. Maleki and Daghir (1967) unun bünyesinde doğal olarak bulunan riboflavin ile zenginleştirme sırasında katılan riboflavinin termal stabilitelerinde fark olduğunu belirtmişlerdir. Zenginleştirme yapılan Arap ekmeklerinde % 91, zenginleştirilmemiş ekmeklerde ise % 81 oranında riboflavin kaldığını belirtmişlerdir (Özkaya ve Özkaya, 1999).

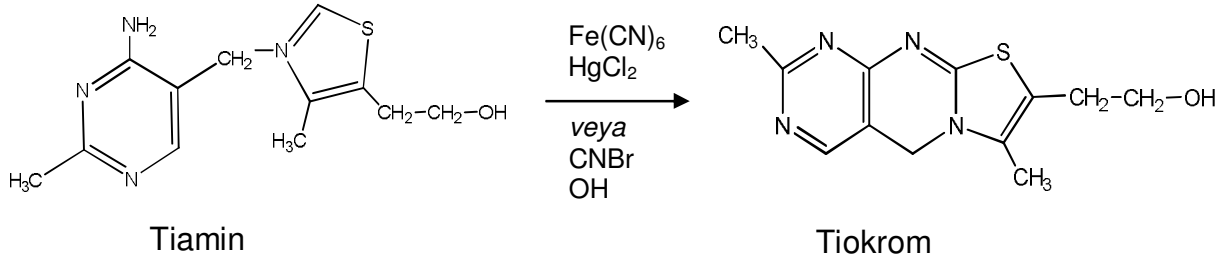
Tez çalışması kapsamında araştırılan B vitaminlerinin gıdalarda tespiti ile ilgili analizler aşağıda verilmiştir.

2.4.1. Tiamin Analizleri

Tiamin analizi için kullanılan metotlar; mikrobiyolojik metotlar, klasik tiokrom metotları ve HPLC metotlarıdır. Mikrobiyolojik metotlar yüksek spesifiklik ve güvenilirlik göstermesine rağmen çok vakit almaktadır. Florimetrik metotlar ise düşük spesifikliğe sahiptir. Bu nedenle, mikrobiyolojik ve florimetrik metotların yerini yüksek spesifiklik ve hassasiyete sahip olan ve kısa sürede analizin tamamlandığı HPLC metotları almaktadır (Esteve et al., 2001).

Tiokrom reaksiyonu 1935 yılından itibaren biyolojik matrislerde tiaminin analizi için kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Tiamin floresan özelliğe sahip değildir. Fakat kendisi ve fosfat esterleri, alkali ortamda potasyum ferrisiyanit ($K_3Fe(CN)_6$) ile reaksiyona girerek kuvvetli mavi floresan veren tiokrom bileşimini oluşturmaktadır. Etkileşime girebilecek diğer floresan bileşikler bulunmadığında tiokromun yoğunluğu örnekteki toplam tiamin

miktarı ile orantılıdır (Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006). Tiokrom reaksiyonunu temel alan tiamin analiz metotlarında asit hidrolizi ve tiaminin fosforlu formlarından ayrılması için enzim uygulaması ile toplam tiamin konsantrasyonu elde edilmektedir (Finglas, 1993). Tiokrom reaksiyonunu temel alan; gıdalar, ekmek ve diğer hububat ürünleri, ekmek ve süt bazlı bebe mamaları için oluşturulmuş resmi metotlar bulunmaktadır (AOAC No. 942.23, 953.17, 957.17, 986.27; AACC No. 86-80; ICC 117, 119).



Şekil 2.6. Tiokrom reaksiyonu.

Son yirmibeş yılda tiamin analizi için yüksek spesifiklik ve duyarlılığa sahip olan ve kısa sürede analizin gerçekleştirildiği HPLC metotları tercih edilmektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizin hızlı gerçekleşmesi ve seçiciliğinden dolayı avantaja sahiptir. Fakat mikrogram düzeyinde tiamin ve riboflavin içeren işlem görmüş gıdaların analizinde UV dedektörler düşük hassasiyetleri nedeniyle uygun değildir. Floresan spektroskopisi hububat ürünlerinde riboflavin ve floresan türevi olan tiokroma dönüşümünden sonra tiaminin belirlenmesi için duyarlı ve seçici bir metottur (Skurray, 1981). Wimalasiri and Wills (1985) saf bileşiklerle yaptıkları çalışmalarında, UV dedektörlü sistem ile dedeksiyon limitinin her iki vitamin için 0.005 µg iken floresan dedektörlü sistemde tiamin için 0.002 µg, riboflavin için ise 0.003 µg olduğunu belirtmişlerdir (Lynch and Young, 2000).

2.4.2. Riboflavin Analizleri

Riboflavin analizi için kullanılan mikrobiyolojik ve florometrik metotların yerini günümüzde HPLC prosedürleri almıştır. Mikrobiyolojik analize dayalı olan resmi metotlar AACC No. 86-72 ve vitamin preparatları için AOAC No. 940.33'tür. Gıdalarda, vitamin preparatlarında, tüketime hazır süt bazlı bebe mamalarında,

hububat, irmik, kırma, pulcuk haline getirilmiş ve patlatılmış hububat ürünleri ve ekmekte riboflavinin doğal floresan şiddetinin ölçümüne dayalı olan AOAC ve AACC resmi metotları da bulunmaktadır (AOAC No. 970.65, 981.15, 985.31; AACC No. 86-70).

Riboflavin doğal floresan özellik gösterdiği için kimyasal derivatizasyona gerek olmadan florometrik olarak analiz edilebilmektedir. FMN ve riboflavin eşit miktarda floresan şiddetine sahipken FAD'ın floresan şiddeti daha azdır. Bu nedenle resmi metotların prosedürlerinde FAD ve FMN'nin riboflavine dönüşümü için gıda örneğinin otoklavda 121 °C'de 30 dk 0.1N HCl ile hidrolizinin gerekli olduğu bildirilmiştir. Ekstrakt glasiyel asetik ile asitleştirilerek ve potasyum permanganat ile yükseltgenerek girişim yapabilecek floresan özellikteki bileşikler tahrip edilmektedir. Oksidasyondan sonra ortamda bulunan fazla miktardaki permanganat ise hidrojen peroksit ilave edilerek parçalanmaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999; Ball, 2006).

Gıdalardaki riboflavin miktarının belirlendiği HPLC prosedürleri riboflavin, FMN ve FAD'nin analizlerini aynı anda gerçekleştirebilmekte veya UV veya floresan dedektörlü sistemde toplam riboflavin miktarını belirleyebilmektedir (Eitenmiller and Landen, 1999). Son yıllarda yayınlanan metotlarda genellikle riboflavin ve tiamin aynı örnek ekstraktının aynı enjeksiyonu ile farklı kromatografi sistemlerinde belirlenebilmektedir (Mauro and Wetzel, 1984; Finglas and Faulks, 1984; Wimalasiri and Wills, 1985; Arella et al., 1996; Marshall et al., 1997; van den Berg et al., 1996; Ndaw et al., 2000; Esteve et al., 2001; Ollilainen et al., 2001). Tiamin ve riboflavinin gıda matrislerinden ekstraksiyonu genellikle seyreltik asit ile otoklavda 121 °C'de inkübasyonunun ardından vitaminin bağlı formlarının serbest hale geçmesi için amilolitik veya proteolitik enzim hidroliz işlemi ile gerçekleşmektedir. Enzimatik hidroliz FMN ve FAD'nin riboflavine dönüşümünün garantilenmesi ve örneğin temizlenmesine katkıda bulunması açısından faydalıdır. Riboflavin direk olarak florometrik olarak ölçülebilirken tiamin floresan türevi olan tiokroma dönüştürüldükten sonra belirlenmektedir. Floresan dedektörün kullanıldığı sıvı kromatografisi ile gıda örneklerinde elde edilen riboflavin miktarları, mikrobiyolojik metot ile elde edilenlere göre genellikle daha düşüktür. Mikrobiyolojik analizde kullanılan birçok

mikroorganizma vitamin aktivitesine sahip olan riboflavin ve FMN ortamında eşit gelişme özelliğine sahiptir. Sıvı kromatografisi metotlarında ise riboflavin FMN'den ayrılmakta ve FMN ölçülmemektedir. FMN'nin riboflavine tam olarak dönüşümünün gerçekleştirilemediği durumda mikrobiyolojik analiz sonuçlarından daha düşük sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle FMN'nin riboflavine enzimatik olarak dönüşümünün gerçekleştirilmesinin önemli olduğu belirtilmiştir (Finglas, 1993; Eitenmiller and Landen, 1999).

2.4.3. Niasin Analizleri

Gıdalarda niasin miktarını belirlemek için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bunlar geleneksel kolorimetrik metot (AOAC, 2000; ICC, 2002), *Lactobacillus plantarum*'u kullanan mikrobiyolojik metot (AACC, 2000; AOAC, 2000) ve çeşitli kromatografik metotlardır. Günümüzde en fazla kullanılan metot *Lactobacillus plantarum*'u kullanan mikrobiyolojik metottur (AOAC 944.13). Gıdalarda niasinin belirlenmesinde önerilen UV dedektör kullanımını içeren birçok HPLC metodu bulunmaktadır (Lahely et al., 1999; Juraja et al., 2003).

AOAC kimyasal metodunda spektrofotometrik olarak belirlenebilen renkli pyridinium türevinin oluşumunda siyanojen bromür kullanılmaktadır. Bu reaksiyon spesifik değildir ve bağlı formdaki niasini de içeren bütün pyridinlerle meydana gelmektedir (Chase et al., 1993). AOAC kolorimetrik metodu König reaksiyonu prensibine dayanmaktadır. Buna göre pridin türevleri; siyanojen bromür, bir aromatik amin ve sülfanilik asit ile reaksiyona girmektedir. Fakat bütün 3-pridin türevlerinin reaksiyona girmesi nedeniyle metodun spesifikliğı düşüktür ve oldukça toksik olan siyanojen bromürün kullanılmasını gerektirmektedir (Rose-Sallin et al., 2001). Mikrobiyolojik metot ile *Lactobacillus casei* veya *Leuconostoc mesenteroides* subs. *mesenteroides* (Ball, 1998) kullanılarak serbest niasin belirlenebilmekte veya nikotinik asit, nikotinamid, nikotinurik asit (inaktif bir metabolit) ve NAD'ye tepki veren (triptofana vermeyen) *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) ile toplam niasin miktarı belirlenebilmektedir. *Lactobacillus plantarum* aynı zamanda hububatlarda bulunan bağlı formdaki niasinden de belirli ölçüde faydalanabilmektedir (Ball, 1998). Resmi metotlarda (AACC, 2000; AOAC, 2000) gıdalardaki toplam niasin aktivitesi

belirlenmektedir. AACC ve AOAC ekstraksiyon prosedürleri örneğin 0.5M H₂SO₄ ile 121-123°C'de 30 dakika otoklavda inkübasyonunu içermektedir (Rose-Sallin et al., 2001).

Niasinin HPLC metotları ile belirlenmesi genellikle ion-pairing ters faz kromatografisi ile UV dedektör ile gerçekleştirilmektedir. Bu tekniğin gıda ürünlerine uygulanması çoğunlukla kartuş ekstraksiyonları ve kolon değişimi gibi kompleks temizleme (clean-up) prosedürleri gerektirmektedir (Chase et al., 1993; Tyler and Genzale, 1990; Van Niekerk et al., 1984; Vidal-Verde and Reche, 1991) (Rose-Sallin et al., 2001). Floresan dedektörün kullanımı ise spesifikliği ve duyarlılığı arttırmaktadır. Fakat niasin doğal olarak floresan özellikte olmadığı için kolon sonrası derivatizasyon ile niasine floresan özelliğin kazandırılması gerekmektedir (Krishnan et al., 1999; Mawatari et al., 1991).

2.4.4. Piridoksin Analizleri

B₆ vitamininin gıda örneklerinde ve tüketime hazır süt bazlı bebe mamalarında belirlenmesi için mikrobiyolojik yöntemler kullanılmaktadır (AOAC 961.15 ve 985.32), fakat günümüzdeki sıvı kromatografisinin kullanıldığı metotların duyarlılığı ve seçiciliği bunların modern gıda analiz laboratuvarlarında kullanımları için bir seçim nedeni olmaktadır. B₆ vitamininin mikrobiyolojik yöntemle analizi için *Saccharomyces carlsbergensis* (*S. uvarum*), *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Neurospora sitophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrahymena pyriformis* gibi çeşitli mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bunların arasında en çok tercih edilen ve kullanılanı *S. uvarum* (ATCC 9080)'dir (Eitenmiller and Landen, 1999). Mikrobiyolojik metodun temel kısıtlaması *S. uvarum*'ün B₆ vitamerlerinin (piridoksin, piridoksal, piridoksamin) ortamında eşit gelişme özelliği göstermemesidir. Piridoksin ve piridoksal ortamında eşit gelişme özelliği gösterirken piridoksamin ortamındaki gelişmesi daha azdır. Bu durum yüksek miktarda piridoksamin içeren gıdalarda miktarın düşük bulunmasına neden olmaktadır (Ball, 2006). *S. uvarum*'ün B₆ vitamerlerinin ortamında eşit gelişme özelliği göstermemesi bu vitamerlerin ayırımını sağlayan kromatografik metotların gelişmesine neden olmuştur. Vitamerler ayrıldıktan

sonra *S. uvarum* ile ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bu prosedür ile AOAC 961.15 metodunun temeli oluşmuştur.

Mikrobiyolojik analizle karşılaştırıldığında sıvı kromatografisi analizlerinin en büyük avantajı yüksek derecedeki spesifikliği ve altı adet vitamerin ve çeşitli metabolitlerin miktarlarının belirlenmesine olanak sağlamasıdır. Sıvı kromatografisinde belirlenmeden önce örneklerin ekstraksiyonu için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Birinci yaklaşım, ticari bir fosfat enzimi ile fosfat esterlerinin hidrolizi sonucu piridoksin, piridoksal ve piridoksamin miktarlarının belirlenmesidir. İkinci yaklaşım, fosforlu vitaminler korunarak altı adet biyolojik aktif formun, glukozid formunun (piridoksin-glukozid) ve metabolitlerin miktarlarının belirlenmesidir. Ekstraksiyon; sülfosalisilik asit, trikloroasetik asit, metafosforik asit ve perklorik asit gibi proteini ortamdaki uzaklaştıran kimyasallar ile tamamlanmaktadır. Üçüncü yaklaşım bütün formların PN'e dönüştürülerek toplam B₆ vitamini miktarının PN olarak hesaplanmasıdır. Dördüncü ve son yaklaşımda ise bağlı formda olmayan B₆ vitamini serbest B₆ vitamini olarak hesaplanmaktadır (Eitenmiller and Landen, 1999).

Ion-exchange ve C18 kolon ile ters faz kromatografisi biyolojik matrislerdeki bütün B₆ formlarını ayırmaktadır. B₆ vitamini analizlerinde yaygın olarak C18 kolonda ters faz kromatografisi kullanılmaktadır. Farklı mobil fazlar kullanılmasına rağmen çoğunlukta ayırımın optimizasyonu için ion-pairing kimyasalları bulunmaktadır. Biyolojik örneklerde B₆ vitamininin belirlenmesinde UV dedektörün hassasiyeti düşük olduğundan genellikle floresan dedektör kullanımı tercih edilmektedir (Olds et al, 1993; Bergaentzle et al., 1995; Eitenmiller and Landen, 1999).

2.4.5. Folik Asit Analizleri

Folat analizinde kullanılan metotlar; mikrobiyolojik, sıvı kromatografisi, ligand bağlama ve radioimmunoassay'dir. Mikrobiyolojik metotlar; hububat ürünlerinde toplam folat analizinin yer aldığı AACC No. 86-47 ve vitamin karışımlarında ve bebe mamalarında folik asitin belirlendiği AOAC No. 944.12 ve 992.05'dir. *L. rhamnosus* doğal gıdalardaki folat analizi için en fazla kullanılan ve kabul gören mikroorganizma olmasına rağmen çeşitli folat formlarının ortamlarında farklı gelişme özelliği gösterdiği bildirilmiştir (Goli and Vanderslice, 1989; Eitenmiller and Landen, 1999). Finglas

(1993) çalışmalarında *L. rhamnosus*'ün 0-1 ng kalibrasyon aralığı ve pH 6.0-6.2 aralığında folat monoglutamatlarını içeren ortamlarda eşit gelişme özelliği gösterdiğini belirtmiştir. Gıdalardaki folatlar resmi olarak sadece toplam folat içeriğini veren mikrobiyolojik yöntemlerle belirlenmektedir. Fakat uzun analiz süresi ve doğruluk derecesinin nispeten düşük olması kullanımını kısıtlamaktadır. Sıvı kromatografisi metotları biyolojik örneklerdeki spesifik folat profilini belirlemede en iyi yaklaşımı sunmaktadır. Sıvı kromatografisi metotlarının asıl avantajı spesifik folat formlarının ve istenilen durumlarda γ -glutamilfolat polimerlerinin miktarlarının belirlenebilmesidir (Gregory, 1989; Eitenmiller and Landen, 1999).

Folatların belirlenmesi için çeşitli sıvı kromatografisi metotları geliştirilmiştir. Fakat bunların çoğu pteromonoglutamik asitin baskın form olarak yer aldığı standart karışımlarına ve bebe mamaları ve kahvaltılık hububat ürünleri gibi zenginleştirilmiş gıdalara uygulanmaktadır. Bu metotlar doğal gıdalara uygulandığında ise örnek temizleme ve saflaştırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Çalışılan sıvı kromatografisi metotlarının çoğu, analiz öncesinde gıda örneklerinin konjugaz enzimi ile muamelesini içeren folat monoglutamatların analizi üzerine yoğunlaşmıştır. Dekonjugaz enziminin seçimi ve folat poliglutamatların monoglutamat seviyesine tam olarak hidrolizini sağlayan reaksiyon koşullarının sağlanması sıvı kromatografisinde doğru miktarların belirlenmesi için gereklidir. Dekonjugaz enzim kaynağı olarak domuz böbreği, insan plazması ve tavuk pankreası kullanılmaktadır. Domuz böbreği ve insan plazması dekonjugaz enzimleri ile monoglutamat formları açığa çıkarken tavuk pankreası enzimi ile diglutamat formları meydana gelmektedir. Goli and Vanderslice (1992) ise tavuk pankreası enzimi kullanıldığında mono ve diglutamat formlarının karışımının oluştuğunu belirtmişlerdir. Tavuk pankreası diğer iki enzim kaynağına göre inhibisyona dayanıklı olmasına rağmen kromatografik çalışmalarda kullanılması önerilmemektedir. Bunun nedeni diglutamat ürünlerinin ticari olarak standartlarının bulunmamasından dolayı saptanması ve miktarının belirlenmesinin zor olmasıdır (Finglas, 1993). Son yıllarda genellikle hububat ürünleri ile yapılan çalışmalarda doğal polyglutamylfolatları monoglutamat türevlerine dönüştüren sıçan plazma dekonjugaz enzimi yer almaktadır (Engelhardt and Gregory, 1990; Pfeiffer et al., 1997; Osseyi et al., 2001; Gujska and Majewska, 2005; Gujska and Kunczewicz, 2006; Póo-Prieto et

al., 2006). Folat dekonjugasyonu amacıyla kullanılan enzim kaynağının analizi yapılan her gıda için optimizasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir (Finglas, 1993).

Sıvı kromatografisi metotlarında folat ekstraksiyonu için örnek hazırlanmasındaki ilk aşama, folatların oksidatif bozulmalarının önlenmesi için stabilize edici madde içeren tampon içerisinde ekstraksiyonudur (Eitenmiller and Landen, 1999). Gıda analizlerinde askorbik asit ve 2-merkaptetanol kullanılan çalışmalar bulunmaktadır (Vahteristo et al., 1996; Pfeiffer et al., 1997; Osseyi et al., 2001; Gujska and Majewska, 2005; Gujska and Kunczewicz, 2006). En etkili antioksidanın asidik koşullarda askorbik asit, nötral pH değerlerinde ise ditiotretiol olduğu belirtilmektedir (Eitenmiller and Landen, 1999).

Gıda örneklerinden folat ekstraksiyonunun tam olarak yapılabilmesi ve daha sonraki aşamaların kolaylaştırılması amacıyla proteinlerin çöktürülmesi ve folat oksidasyonunu veya türevleri arasındaki dönüşümü katalizleyen enzimlerin inaktivasyonu için 100°C'de ısıtma veya otoklavlama uygulanmaktadır. Ayrıca bağlı folatların serbest hale geçmesi için α -amilaz ve proteaz enzimleri ile hidroliz de uygulanmaktadır. Birçok sıvı kromatografisi metotlarında olduğu gibi γ -glutamil polimerik folatları monoglutamat formlarına dönüştürmek için konjugaz enzimi uygulaması gerekmektedir. Bu enzimlerin beraber yer aldığı üçlü enzim ekstraksiyon prosedürü de gıda analizlerinde kullanılmaktadır. Bazı gıdalarda konjugaz enziminin tek başına kullanılması ile elde edilen sonuca göre üçlü enzim ekstraksiyonu ile daha yüksek folat değerlerinin elde edildiği belirtilmektedir. Son yıllarda bazı gıda hazırlama metotları içerisinde afinite kromatografisinin de yer aldığı görülmektedir (Eitenmiller and Landen, 1999).

Çeşitli gıda matrislerinde folatların belirlenmesinde birçok HPLC metodu kullanılmaktadır (Vahteristo et al., 1996; Pfeiffer et al., 1997; Finglas et al., 1999; Osseyi et al., 2001; Kariluoto et al., 2001; Kariluoto et al., 2004; Freisleben et al., 2003; Jastrebova et al., 2003). Fakat hububat ürünlerine ait uygun saflaştırma metotlarının yetersizliği nedeniyle farklı folat formlarının analizi sınırlanmaktadır (Pfeiffer et al., 1997; Kariluoto et al., 2001; Freisleben et al., 2003). HPLC analizi ile gıdalarda doğal folat konsantrasyonlarının belirlenmesi için UV dedektörün yeterli

derecede hassas olmadığı, ölçüm için florometrik dedektörün gerekli olduğu ifade edilmiştir (Finglas et al., 1999).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışma kapsamında ticari ekmeklik buğday unu (Çubuk Un Fabrikası A. Ş., Kırşehir) kullanılmıştır.

3.2. Kimyasallar ve Diğer Yardımcı Maddeler

Vitamin standartları olarak tiamin hidroklorid, riboflavin, piridoksin hidroklorid, nikotinik asit, nikotinamid, folik asit (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schlosser, Almanya) kullanılmıştır. Vitamin analizleri için kullanılan enzimler; takadiastase (Fluka, İsviçre) alfa-amilaz (*Aspergillus oryzae* kaynaklı, Sigma, ABD), papain (Fluka, İsviçre), β -glukosidaz (Sigma, ABD), β -amilaz (Sigma, ABD), asit fosfataz (Sigma, ABD), sıçan plazma konjugaz (Pel-Freez, ABD)'dir. Vitaminler için sertifikalı referans materyal olarak tam buğday unu (CRM 121) ve süt tozu (CRM 421) (BCR, Belçika) kullanılmıştır. Metanol (HPLC grade), asetonitril (HPLC grade), askorbik asit, potasyum ferrisiyanit, demir (II) sülfat heptahidrat, L-glutathione (Sigma-Aldrich, Almanya); su (HPLC grade), sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit, 2-merkaptoetanol, sodyummetabisülfid (Merck, Almanya); sodyum asetat trihidrat, glasiyel asetik asit, potasyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, bakır (II) sülfat pentahidrat, trietilamin, fosforik asit (% 85), etanol (absolut), izobutanol, hidrojen peroksit, hidroklorik asit (Riedel-de Haën, Almanya); sülfürik asit, amonyum hidroksit (J.T.Baker, Hollanda); dipotasyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, tetrabütülamonyum fosfat monobazik, sulfanilik asit, sodyum dithionit, fosfor pentoksit (Fluka, İspanya), Whatman filtre kağıdı (İngiltere), şırınga ucu filtre (0.2 ve 0.45 μ m) (Alltech, ABD) ve katı faz ekstraksiyon kartuşları (Waters, İrlanda) da kullanılmıştır.

3.3. Ekipmanlar

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) sistemi (Agilent 1200 serisi, İsviçre); gaz uzaklaştırıcı (G1322A), dörtlü pompa sistemi (G1311A), oto örnekleyici (G1329A), ısı kontrol ünitesi (G1330B), kolon fırını (G1316A), floresans dedektör (G1321A) ve UV dedektör (G1365B) bölümlerinden meydana gelmektedir. Vitaminlerin analizlerinde kullanılan

kolonlar ise μ -Bondapak C18 (3.9 mm x 300 mm, 10 μ m, Waters, ABD), Prevail C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m, Alltech, ABD), Lichrospher RP 18-5 endcapped (4.0 mm x 250 mm, 5 μ m, Hichrom, İngiltere), Inertsil ODS3 (250mm x 4.6mm, 5 μ m, Hichrom, İngiltere) Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m, Agilent, ABD), ODS Hypersil (4.6 x 150 mm, 3 μ m, Thermo, İngiltere)'dir. Koruyucu kolon olarak RP18 (4 mm x 4 mm, 5 μ m, Hichrom, İngiltere) sisteme entegre edilmiştir.

Çalışmada ekmek yapımında kullanılan düzenek; yoğurucu, şekil verici, fermentasyon kabini (National M.F.G. Co., ABD) ve elektrikli döner fırından (Despatch, ABD) oluşmaktadır. Ekmeklerin hacmi, hacim ölçer (National M.F.G. Co., ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Bunların yanısıra çalışma sırasında kullanılan diğer ekipmanlar ise çalkalamalı su banyosu (Kotterman Labortechnik, Almanya), ultrasonik su banyosu (FALC, İtalya), UV spektrofotometre (Agilent, ABD), floresans spektrofotometre (Varian Co., ABD), enjektör pompa (Biasis Ltd. Şti., Türkiye), santrifüj (Sigma 3-18K, Almanya), homojenizatör (Virtis, ABD), derin dondurucu (Sanyo, Japonya), farinograf (Brabender, Almanya), renk ölçüm cihazı (Minolta spektrofotometre CM-3600d, Japonya), tekstür analizörü (TA Plus, Lloyd Instruments, İngiltere), otoklav (Hirayama, Japonya), pH metre (Schott CG840, Almanya), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), Glutork 2020 (Falling Number, İsveç), etüv (Şimşek Labortechnik, Türkiye), mutfak robotu (Raks MR 1001, Türkiye), siyah ışık lambası (Phillips, Hollanda)'dır.

3.4. Metotlar

3.4.1. Un örneğinin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi

3.4.1.1. Rutubet miktarı tayini

Rutubet miktarı, AACC Metodu No. 44-01 (AACC, 1990)'ye göre belirlenmiştir.

3.4.1.2. Protein miktarı tayini

Protein miktarı, AACC Metodu No. 46-12 (AACC, 1990)'ye göre belirlenmiştir.

3.4.1.3. Kül miktarı tayini

Kül miktarı, AACC Metodu No. 08-01 (AACC, 1990)'ye göre saptanmıştır.

3.4.1.4. Yaş gluten miktarı tayini

Yaş gluten miktarı, AACC Metot No: 38-11 (AACC, 1990)'ye göre saptanmıştır.

3.4.1.5. Kuru gluten miktarı tayini

Kuru gluten miktarı, elde edilen yaş glutenin Glutork kurutma cihazında 5 dakika kurutulduktan sonra desikatörde soğutulup tartılması ile saptanmıştır (Özkaya ve Kahveci, 1990).

3.4.1.6. Zeleny sedimentasyon testi

Un örneğinin sedimentasyon değeri AACC Metodu No. 56-61A (AACC, 1990)'ye göre belirlenmiştir.

3.4.1.7. Modifiye sedimentasyon testi

Modifiye sedimentasyon testi, AACC Metodu No. 56-61A (AACC, 1990)'de bildirilen sedimentasyon değeri tayininin modifiye edilmiş şeklidir. Sedimentasyon silindirlerine un örneklerinden 3.2 g (%14 rutubet esasına göre) tartılarak üzerine 50 ml bromfenol mavisi çözeltisi ilave edilip çalkalama aletinde 5 dakika çalkalanır. 37°C deki su banyosunda 2 saat inkübe edilir. Süre sonunda 25 ml sedimentasyon test çözeltisi ilave edilerek alette 5 dakika daha çalkalanır. Düz bir zemin üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra çökelti hacmi okunur (Köksel vd., 2000).

3.4.1.8. Farinogram özelliklerinin belirlenmesi

Un örneğinin su absorpsiyonu, hamur gelişme süresi, stabilite ve yoğurma tolerans indeksi farinograf cihazı ile AACC Metodu No. 54-21 (AACC, 1990)'ye göre saptanmıştır. Belirlenen kriterler Shuey (1984)'e göre değerlendirilmiştir.

3.4.2. Un Örneğinin Zenginleştirilmesi

Çalışma kapsamında un örneğinin zenginleştirilmesi için DSM Nutritional Products Europe Ltd. (İsviçre) firmasından temin edilen B vitaminleri karışımı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Vitamin karışımı tavsiye edilen günlük besin alım miktarı

Çizelge 3.1. Vitamin karışımının içeriği (Miktarlar 1 kg karışım bazında verilmiştir.).

Vitaminler	Miktar
<i>Tiamin (Vitamin B₁)</i>	<i>37.692 mg</i>
<i>Riboflavin (Vitamin B₂)</i>	<i>51.692 mg</i>
<i>Piridoksin (Vitamin B₆)</i>	<i>64.615 mg</i>
<i>Niasinamid</i>	<i>630.000 mg</i>
<i>Folik asit</i>	<i>5.385 mg</i>
<i>Vitamin B₁₂</i>	<i>26.923 µg</i>

(RDA) dikkate alınarak una katılmıştır. Ekmek yapımı sırasında vitamin karışımı suda çözüldükten sonra diğer bileşenlerle beraber una eklenmiştir.

3.4.3. Ekmek yapma denemesi

Kontrol ve zenginleştirilmiş un örneklerinden modifiye edilmiş doğrudan hamur yapma tekniğiyle ekmek yapma metoduna göre (AACC Method No. 10-10B) farklı pişme süresi (20, 25, 30 dakika) ve farklı fırın sıcaklıklarında (200, 220, 240°C) ekmekler Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarında yapılmıştır.

Ekmeklerin yapılması için % 14 rutubet esasına göre 100 g un tartılmış ve üzerine 0.2 g ekmek katkısı eklenmiştir. Ekmek katkısı formülasyonunda emülgatör, fungal amilaz, ksilanaz, C vitamini ve un bulunmaktadır. Unun üzerine 25 ml % 8'lik maya çözeltisi, 25 ml % 6'lık tuz çözeltisi, 10 ml suda çözülmüş vitamin karışımı çözeltisi (% 0.15'lik) ve farinografta belirlenen su absorpsiyonu kadar su miktarı tamamlanacak şekilde ilave damıtık su (30°C) eklenerek yoğurucuda hamur haline getirilmiştir. Yoğurucuda karıştırma süresi farinogramda belirlenen gelişme süresine (4 dk) göre 1 dk olarak belirlenmiştir.

Hamurun fermentasyon süresi 1. fermentasyon 30 dakika ve 2. fermentasyon 30 dakika olacak şekilde toplam 60 dakikadır. Hamur şekillendirilip tavalara alındıktan sonra 30°C'de % 75 nispi rutubette 55 dakikalık son fermentasyona bırakılmıştır. Daha sonra hamur örnekleri 200, 220, 240°C'deki fırın sıcaklıklarında 20, 25, 30 dakika elektrikli döner fırında pişirilmiştir.

3.4.4. Ekmek örneklerinin kalite özelliklerinin incelenmesi

Farklı proses koşullarında üretilen ekmeklerin hacim, renk tayinleri ve duyuşal değerlendirmeleri yapılmıştır.

3.4.4.1. Ekmek hacminin ölçülmesi

Ekmek hacmi, ekmekler oda sıcaklığında (20°C, % 45 nisbi nem) iki saat soğutulduktan sonra kolza tohumu kullanılarak yer değiştirme esasına dayalı olarak hacim ölçerde belirlenmiştir. Hacim ölçümleri yapılan ekmekler diğer analizler uygulanıncaya kadar polietilen torbalarda saklanmıştır.

3.4.4.2. Ekmek örneklerinin renk analizi

Ekmek örneklerinin iç kısımlarının ve kabuk kısımlarının (üst kabuk, yan kabuk) renkleri spektrofotometre ile ölçülmüştür. Hunter renk değerleri *L*, *a* ve *b*'den oluşan üçlü skalada *L*=100 beyaz, *L*=0 siyah; yüksek pozitif *a* kırmızı, yüksek negatif *a* yeşil; yüksek pozitif *b* sarı ve yüksek negatif *b* mavi olarak değerlendirilmiştir. Ekmek örneklerinin üst ve yan kabuklarında iki, iç kısımlarında ise beş farklı noktada ölçüm yapılmıştır.

3.4.4.3. Ekmek örneklerinin duyuşal değerlendirilmesi

Ekmek örneklerinin duyuşal değerlendirilmesinde önce kontrol örnekleri belirlenmiştir. Daha sonra örnekler ekmek içi rengi, ekmek içi gözenek yapısı, yumuşaklık gibi kalite kriterleri açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirme işlemi ekmek örnekleri polietilen torbalarda oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra yapılmıştır. Ekmek içi gözenek yapısı, ekmek içi rengi ve yumuşaklığı 1-10 skalasında (1: en kötü, 10: en iyi) değerlendirilmiş ve ortalama değerler verilmiştir.

3.4.4.4. Ekmek örneklerinin vitamin analizleri için hazırlanması

Ekmek örnekleri kabuk, iç ve bütün olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Etüvde 38°C'de 5 saat kadar bekletildikten sonra mutfak robotu kullanılarak öğütülen ekmekler 1 mm'lik elekten elenmiştir.

3.4.5. B vitaminlerinin analizleri

Farklı proses koşullarında üretilmiş olan ekmek örnekleri, un ve hamur örneklerinin tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin ve folik asit analizlerinin yapılabilmesi için HPLC metotları ile denemeler yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak vitaminler için uygun olan kromatografik koşulların belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Kromatografik koşulların saptanmasının ardından vitaminlerin örnek matriksinden ekstraksiyonu için farklı metotlar denenmiş ve gerekli durumlarda metotların modifikasyonu üzerinde çalışılmıştır. Karşılaştırmak amacıyla tiamin, riboflavin ve niasin örneklerindeki vitamin miktarları standart AACC metotları ile de belirlenmiştir. Bütün vitaminler için yapılan kromatografik çalışmalar üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çalışılan her vitaminin sertifikalı referans materyali ile HPLC'de analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.5.1. Ekmek örneklerinin tiamin ve riboflavin analizleri

HPLC sisteminde vitamin analizlerine tiamin ve riboflavinin beraber belirlenebileceği koşulların araştırılması ile başlanmıştır.

Ekstraksiyon çalışmaları

Erbaş et al. (2005)'a göre normal ve zenginleştirilmiş ekmek örneklerinden suda çözünen vitaminlerin ekstraksiyonu yapılmıştır (Şekil 3.1).

Ndaw et al. (2000) metoduna göre sadece takadiastaz enziminin kullanıldığı prosedür ile ekstraksiyon denemesi yapılmıştır (Şekil 3.2). Ndaw et al. (2000)'a göre uygulanan ekstraksiyon yönteminden elde edilen ekmek ekstraktına katı faz ekstraksiyon yöntemi Cho et al. (2000) ve Ekinci (2005)'nin metotları modifiye edilerek uygulanmıştır (Şekil 3.3).

HPLC sistemine floresans dedektörün entegre edilmesinin ardından ekmek örneğinden B₁ ve B₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu Batifoulier et al. (2005) metoduna göre yapılmıştır (Şekil 3.4)

Diğer bir uygulamada ekmek örneğinden B₁ ve B₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu Batifoulier et al. (2005) metoduna göre yapılmıştır. Daha sonra bu örneklere katı faz ekstraksiyon yöntemi de uygulanmıştır.

2 g ekmek örneğine 4 ml hekzan ve 16 ml su eklenir.



Karışım 2 dakika homojenize edilir.



3250 g'de 30 dakika santrifüjlenir.



Supernatant Whatman No.42 filtre kağıdından süzülür.

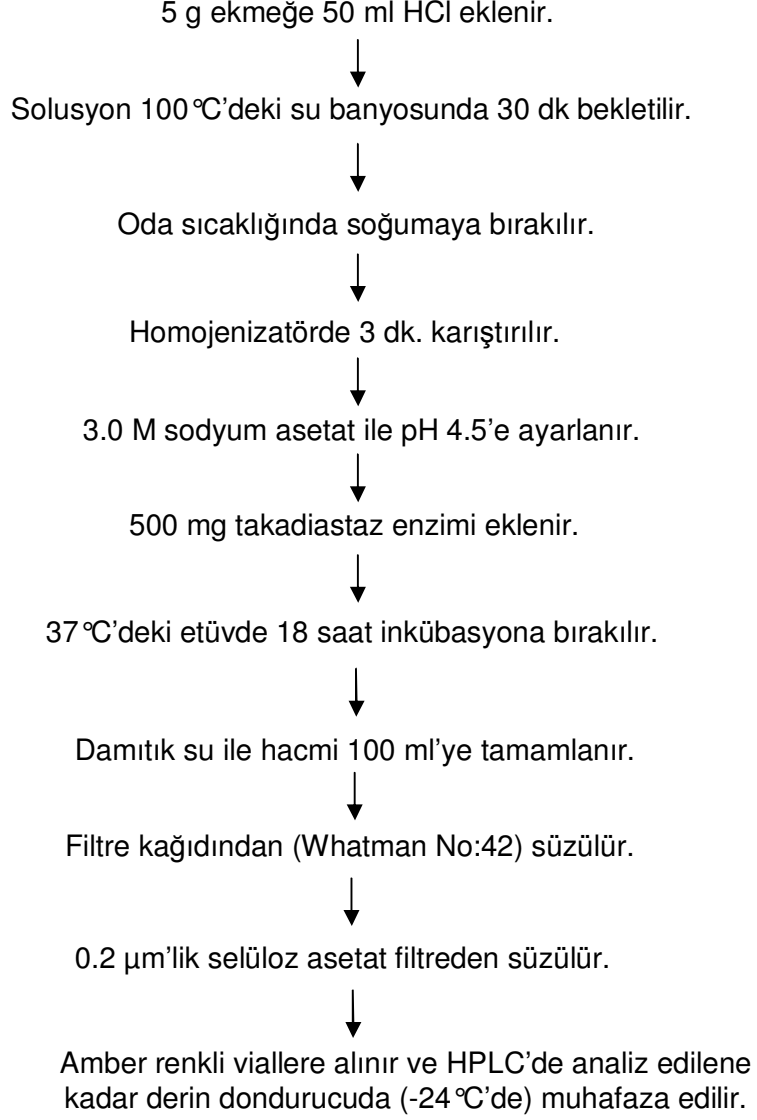


0.45 µm'lik filtreden geçirilir.

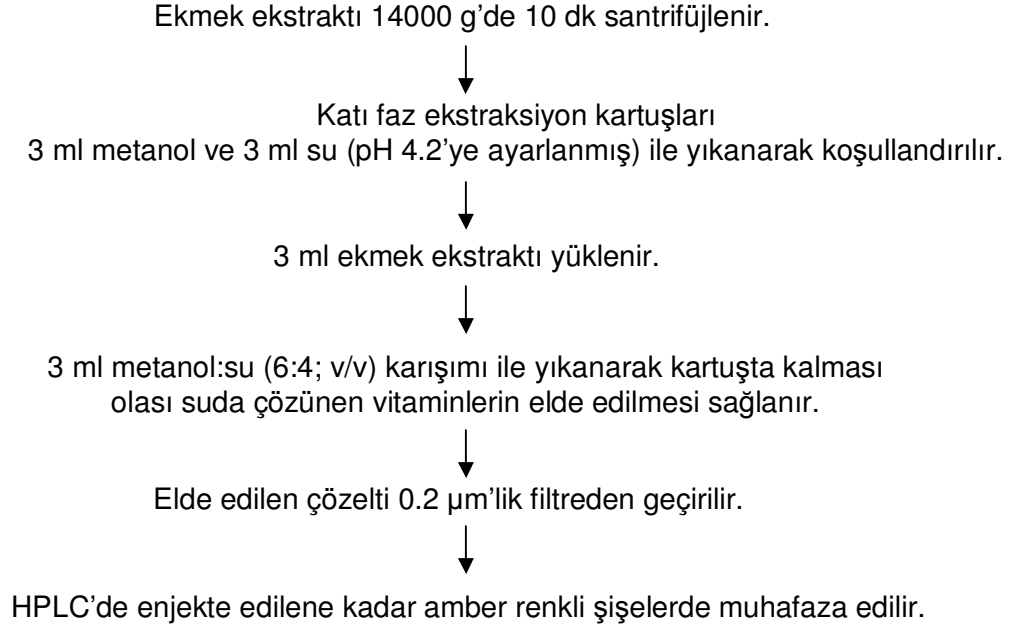


HPLC'de enjekte edilene kadar amber renkli şişelerde muhafaza edilir.

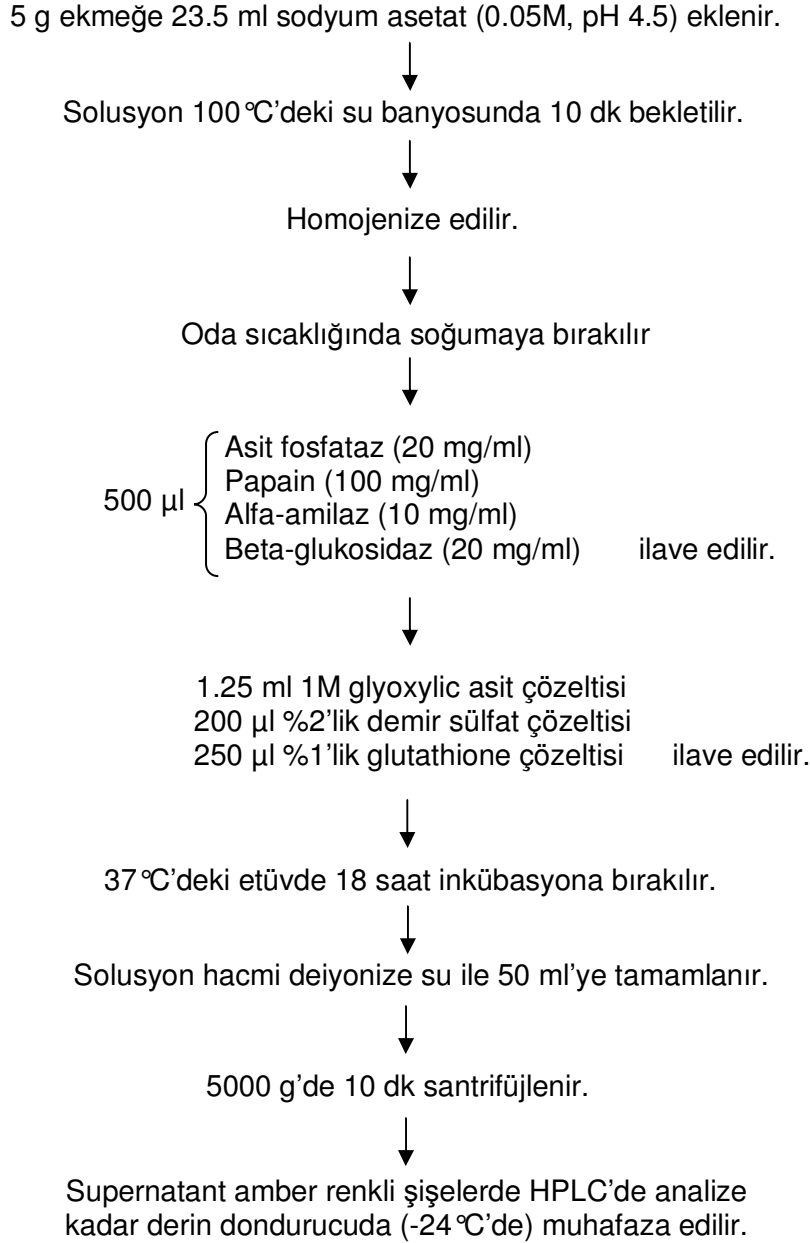
Şekil 3.1. Erbaş et al. (2005)'a göre ekmek örneğinden B vitaminlerinin ekstraksiyonu.



Şekil 3.2. Ndaw et al. (2000) metoduna göre ekmeğinden B₁ ve B₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu.

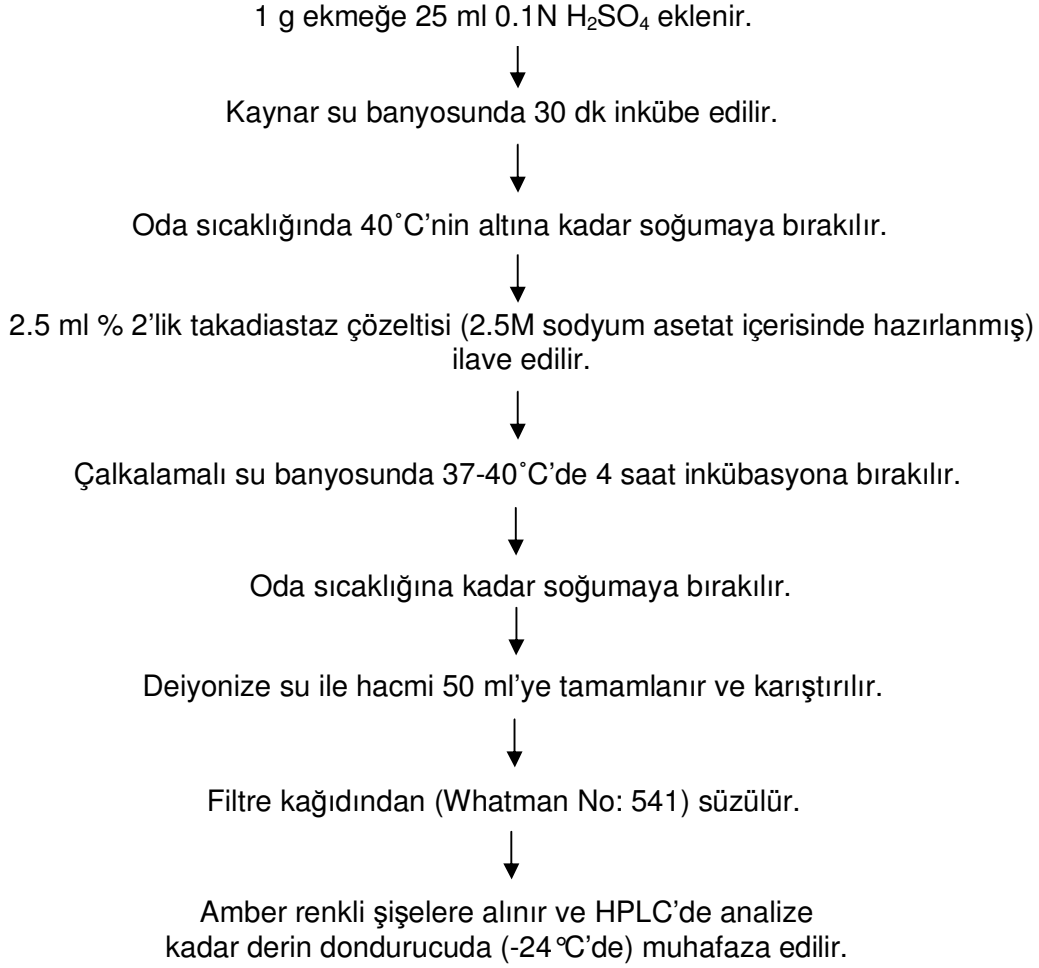


Şekil 3.3. Katı faz ekstraksiyon yöntemi (Cho et al., 2000; Ekinci, 2005).



Şekil 3.4. Batifoulier et al. (2005) metoduna göre ekmekten B₁ ve B₂ vitaminlerinin ekstraksiyonu.

Son olarak ekmek örneklerinden tiamin ve riboflavinin ekstraksiyonu AACC Metodu No. 86-80 ve 86-70 (AACC, 1990)'ye göre yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tiamin ve riboflavinin AACC Metodu No. 86-80 ve 86-70 (AACC, 2000)'ye göre ekmekten ekstraksiyonu.

Kromatografi Koşulları

Çalışmalara ilk olarak Erbaş et al. (2005)'in metodu ile başlanmıştır. Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir.

Kolon: Inertsil ODS3 (4.6mm x 250mm, 5 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 20°C

Mobil faz çözeltisi: 50 mM KH₂PO₄ - asetonitril (95:5; v/v) (izokratik)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: UV dedektör (254 nm)

İkinci olarak Finglas and Faulks (1984)'un metodu ile çalışmalar yapılmıştır. Uygulanan kromatografik koşullar aşağıda belirtilmiştir.

Kolon: Hypersil H3 ODS (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 20°C

Mobil faz çözeltisi: Metanol-su (30:70, v/v) (izokratik ayırım)

Mobil faz akış hızı: 0.5 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: UV dedektör (dalga boyu tiamin için 234 nm, riboflavin için 268 nm'dir)

Üçüncü olarak tiamin ve riboflavinin analizi için Alltech (2005)'te verilen kromatografik koşullar ile tiamin ve riboflavin analizi üzerinde çalışılmıştır.

Kolon: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 20°C

Mobil faz çözeltisi: 25 mM KH₂PO₄ (pH 3.0) (A) ve asetonitril (B) (gradyent)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: UV dedektör (dalga boyu tiamin ve riboflavin için 254 nm'dir)

Çizelge 3.2. Mobil faz: 25 mM KH₂PO₄ (A) ve asetonitril (B) karışımı (gradyent).

Zaman (dk)	%B	Akış hızı (ml/dk)
0	3	1
4	3	1
10	30	1
15	30	1

Batifoulier et al. (2005) metoduna göre yapılan diğler bir çalışmada aşağıda belirtilen kromatografik koşullar ile çalışılmıştır.

Kolon: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 20 °C

Mobil faz çözeltilisi: 0.05 M NaAc-Metanol (30:70; v/v, pH 6)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (eksitasyon ve emisyon dalgaboyları B₁ vitamini için 365 nm ve 435 nm, B₂ vitamini için ise 422 nm ve 522 nm'dir)

B₁ ve B₂ vitaminleri Finglas and Faulks (1984)'un yöntemi modifiye edilerek aşağıdaki koşullarda HPLC ile belirlenmiştir. Vitamin stok ve standart çözeltilerinden tiamin hidroklorid suda, riboflavin ise metanol-su (30:70, v/v) çözeltilisinde hazırlanmıştır.

Kolon: µ-Bondapak C18 (3.9 mm x 300 mm, 10 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30 °C

Mobil faz çözeltilisi: metanol-su (30:70, v/v)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (eksitasyon ve emisyon dalgaboyları B₁ vitamini için 365 nm ve 435 nm, B₂ vitamini için ise 450 nm ve 510 nm'dir)

B₁ vitamininin belirlenebilmesi için analiz öncesinde floresans özellikteki türevi olan tiokroma dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla Finglas and Faulks (1984)'un tiokrom oluşturma metodu modifiye edilerek kullanılmıştır (şekil 3.6).

5 ml ekstrakt üzerine 1 ml 0.18 M potasyum ferrisiyanit çözeltisi ilave edilir.



Vorteks ile 1 dakika karıştırılır.



1 dakika karanlıkta (amber renkli şişelerde) bekletilir.



0.2 µm'lik filtreden geçirilerek HPLC'de analizi yapılır.

Şekil 3.6. Finglas and Faulks (1984)'un modifiye edilmiş tiokrom oluşturma metodu.

3.4.5.2. Niasin analizleri

Ekstraksiyon çalışmaları

Ekmek örneklerinde niasin miktarının belirlenebilmesi için ilk olarak Lahély et al. (1999)'un metodu ile çalışmalara başlanmıştır. Ekstraksiyon prosedürü Şekil 3.7'de verilmiştir. Daha sonra farklı bir ekstraksiyon yöntemi öneren Rose-Sallin et al. (2001)'un metodu ile çalışmalara devam edilmiştir (Şekil 3.8).

Kromatografi çalışmaları

Niasinin kromatografik olarak belirlenebilmesi için ilk olarak Lahély et al. (1999)'un metodunun koşulları ile çalışmalara başlanmıştır.

Kolon: Lichrospher RP 18-5 endcapped (4.0 mm x 250 mm, 5µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30°C

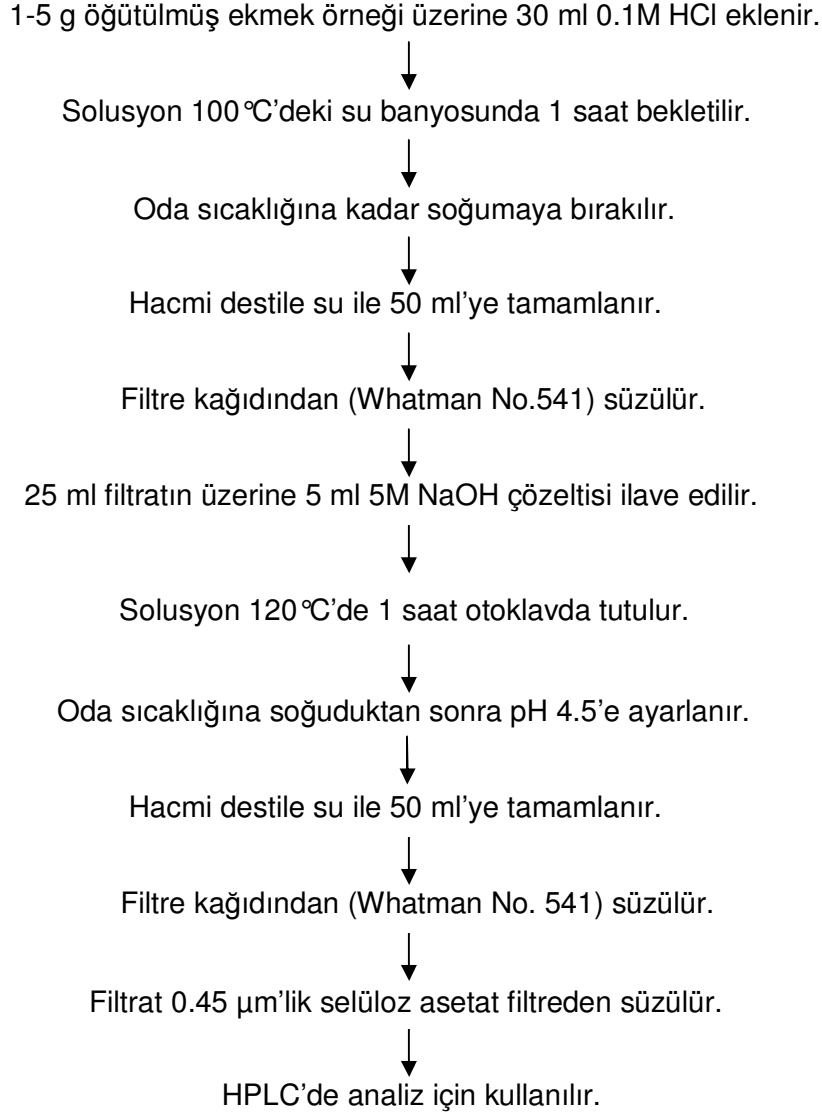
Mobil faz çözeltisi: 9.54 g potasyum dihidrojen fosfat, 7.6 ml % 30'luk hidrojen peroksit ve 1 ml 5×10^{-3} M bakır (II) sülfat 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

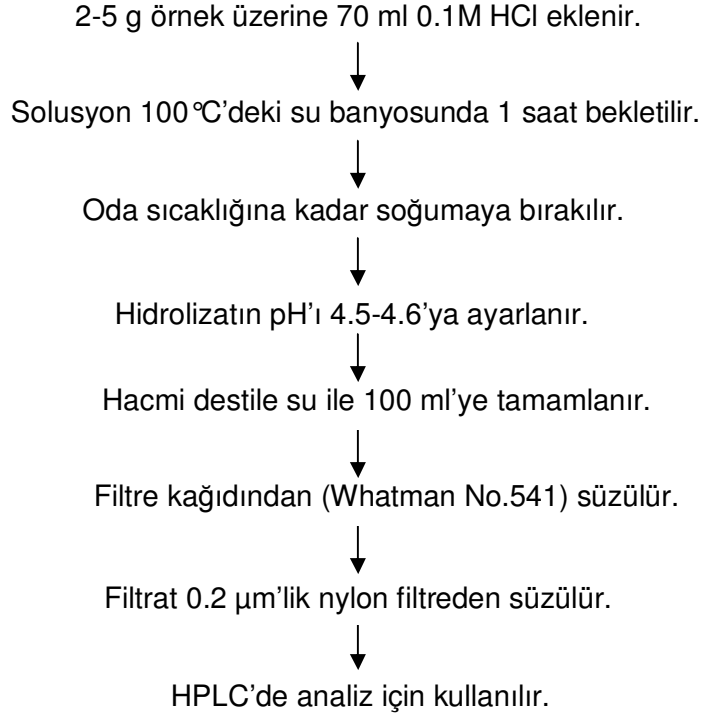
Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (322 nm eksitasyon, 380 nm emisyon)

Bu metotta niasine kolon sonrası derivatizasyon ile floresan özellik kazandırılarak gıdalardaki miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kolon sonrası derivatizasyon için UV ışımalarının sağlanması amacıyla 10 m x 0.6 mm boyutundaki teflon boru siyah ışık lambasının (300-400 nm, 8W) etrafına sarılarak kolon ile floresans dedektörün arasına bağlanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.7. Lahély et al. (1999)'a göre gıdalardan niasinin ekstraksiyon metodu.



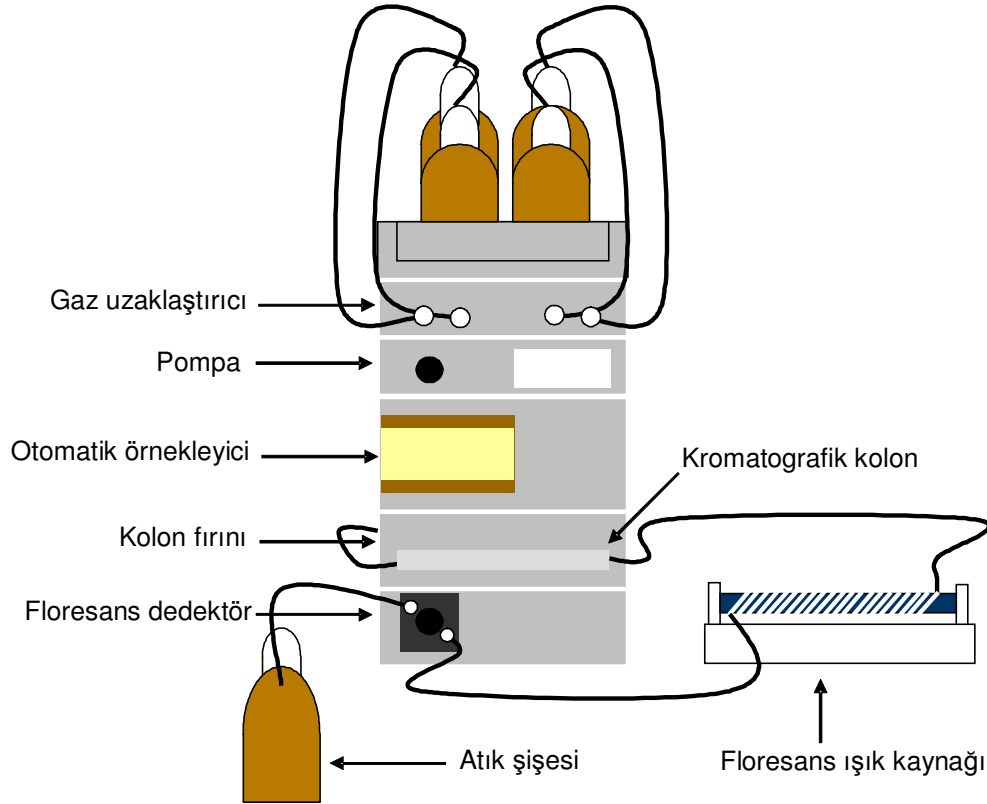
Şekil 3.8. Rose-Sallin et al. (2001)'e göre gıdalardan niasinin ekstraksiyon metodu.

Rose-Sallin et al. (2001) metodunun kromatografik bölümü incelendiğinde nikotinic asit ve nikotinamid piklerinin alanlarının belirlendiği ve sonucun konsantrasyonların toplanarak niasin miktarı şeklinde verildiği görülmektedir. Rose-Sallin et al. (2001) metodunda mobil faz olarak Lahély et al. (1999)'daki mobil faz (A) ile mobil faz A-asetonitril (90:10, v/v) (mobil faz B) karışımı gradiyent olarak uygulanmaktadır. Mobil faz B, kolonun örnek solusyonu ile kirlenerek kolon sonrası reaksiyonu etkilemesini engellemek için yıkama basamağı olarak kullanılmaktadır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Rose-Sallin et al. (2001) metoduna göre gradiyent ayırım.

Zaman (dk)	Mobil Faz
0	A
33.5	A
34	B
36	B
36.5	A
51	A

Yıkama işleminin analiz süresini 51 dakikaya çıkarmasına rağmen nikotinic asit ve nikotinamidin analizinin tekrarlanabilirliğini arttırdığı belirtilmiştir. Nikotinic asit ve nikotinamidin stok ve standart çözeltileri suda (HPLC grade) hazırlanmıştır. Ekmek örneklerinde niasinin analizi için Rose-Sallin et al. (2001) metodu modifiye edilmiş ve analiz aşağıda verilen kromatografik koşullarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Niasin analizinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi.

Kolon: Lichrospher RP 18-5 endcapped (4.0 mm x 250 mm, 5µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30°C

Mobil faz çözeltisi: 9.54 g potasyum dihidrojen fosfat, 7.6 ml % 30'luk hidrojen peroksit ve 1 ml 5×10^{-3} M bakır (II) sülfat 1L'ye tamamlanarak hazırlanan çözelti (mobil faz A) ile mobil faz A - asetonitril (90:10, v/v) (mobil faz B) (gradyent)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

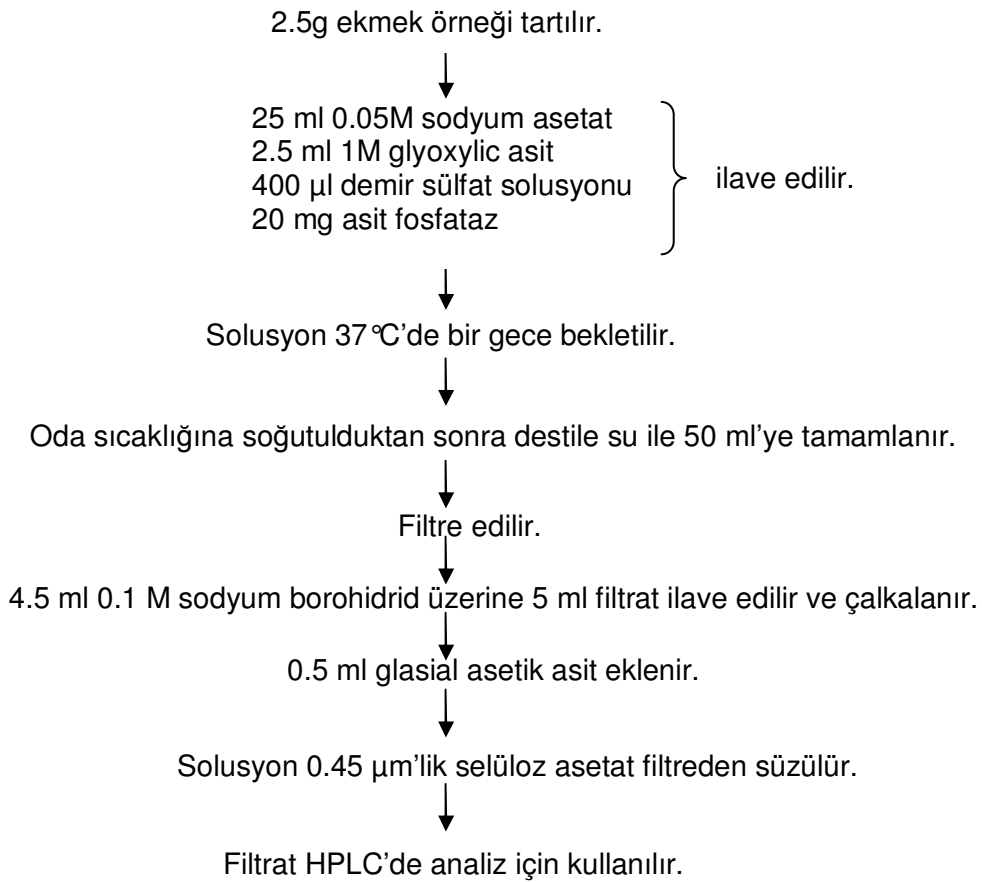
Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (322 nm eksitasyon, 380 nm emisyon)

3.4.5.3. Piridoksin analizleri

Ekstraksiyon çalışmaları

B₆ vitamininin ekmek örneklerinden ekstraksiyonu için ilk olarak Bergaentzle et al. (1995)'un metodu üzerinde çalışılmıştır (Şekil 3.10). Daha sonra Batifoulier et al. (2005) ve Batifoulier et al. (2006) metodlarındaki koşullar gözönüne alınarak çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 3.10. Bergaentzle et al. (1995) metoduna göre B₆ vitamininin ekstraksiyonu.

Kromatografi çalışmaları

Bergaentzle et al. (1995)'un metoduna göre ayırım aşağıda verilen kromatografik koşullarda ters faz iyon çifti koromatografisi ile gerçekleştirilmiştir.

Kolon: Lichrospher RP 18-5 endcapped (4.0 mm x 250 mm, 5µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30°C

Mobil faz çözeltisi: Asetonitril- 0.3×10^{-3} M sodyum oktano sulfonat içeren 0.05 M potasyum dihidrojen fosfat, pH 2.5 (4:96, v/v) (izokratik)

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (290 nm eksitasyon ve 395 nm emisyon)

Daha sonra Batifoulier et al. (2005 ve 2006)'un metoduna göre aşağıda belirtilen kromatografik koşulları üzerinde çalışılmıştır.

Kolon: Prevail C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30°C

Mobil faz çözeltisi: 0.075 mM sodyum perklorat ve % 0.05 trietilamin içeren 0.07 mM sodyum dihidrojen fosfat tamponu, pH 3.38 – asetonitril (90:10, v/v) karışımı (izokratik)

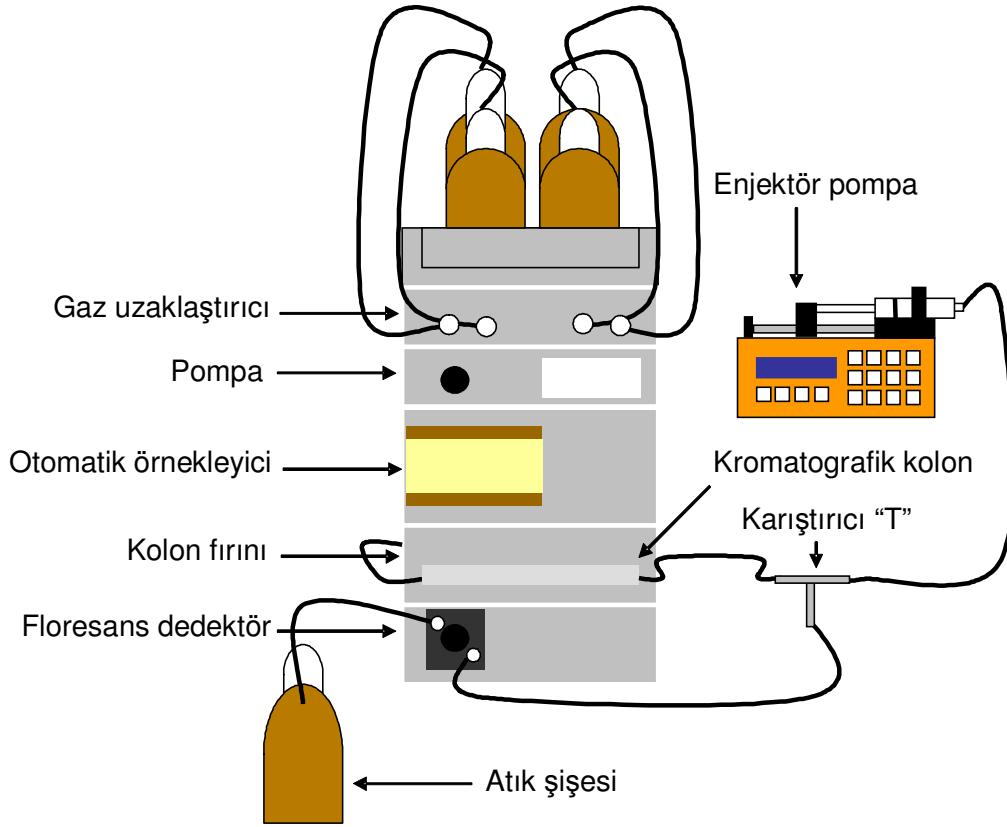
Mobil faz akış hızı: 1 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: Floresans dedektör (290 nm eksitasyon ve 395 nm emisyon)

Kolon sonrası derivatizasyon için 1 g/L sodyummetabisülfid içeren 123 mM sodyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 11.0) enjektör pompa yardımıyla 0.2 ml/dk akış hızında sisteme dahil edilmiştir. Kolon sonrası derivatizasyon için kolon çıkışı ile enjektör pompa arasında T bağlantısı ile birleşme sağlanmış, sonrasında 50 cm'lik 1/16 x 0.020` teflon boru kullanılarak dedektöre bağlantı yapılmıştır. Floresans dedektör ile

325 nm eksitasyon, 400 nm emisyon dalgaboylarında analiz yapılmıştır. Analizin gerçekleştirildiği HPLC sistemi Şekil 3.11’de görülmektedir.



Şekil 3.11. B₆ vitamini analizinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi.

Stok ve standart piridoksin hidroklorid çözeltileri suda (HPLC grade) hazırlanmıştır.

Kolon sonrası derivatizasyon amacıyla kullanılan tampon çözeltinin (1 g/L sodyummetabisülfid içeren 123 mM sodyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 11.0)) ve ekmek ekstraktının HPLC analizi öncesinde sodyum borohidrid ile reaksiyonunun analiz sonuçları üzerinde etkisi de incelenmiştir.

3.4.5.4. Folik asit analizleri

Ekstraksiyon çalışmaları

Ekmek örneklerinde HPLC ile folik asit miktarının belirlenebilmesi amacıyla Osseyi et al. (2001) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

Kromatografi çalışmaları

Ekmek örneklerinde HPLC ile folik asit miktarının belirlenebilmesi amacıyla Osseyi et al. (2001) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Ayırım aşağıda verilen kromatografik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Kolon: ODS Hypersil (4.6 x 150 mm, 3 µm) ters faz kolonu

Kolon fırını sıcaklığı: 30 °C

Mobil faz çözeltisi: 5 mM tetrabutilamonyum dihidrojen fosfat içeren fosfat tamponu (3.5 mM KH₂PO₄ ve 3.2 mM K₂HPO₄, pH 6.8) ve metanol (% 24) karışımı (izokratik)

Mobil faz akış hızı: 0.7 ml/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Dedektör: UV dedektör (280 nm)

3.4.5.5. Ekmek örneklerinin B vitamini miktarlarının standart AACC metotları ile belirlenmesi

Tiamin ve riboflavin tayini

HPLC yöntemlerinin standart AACC yöntemleri ile karşılaştırılması amacıyla ekmek örneklerinin B₁, B₂ ve B₃ vitamini miktarları sırasıyla AACC Metodu No. 86-80, 86-70 ve 86-50A (AACC, 2000)'ye göre belirlenmiştir.

B₁ vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-80'e göre belirlenmesi

B₁ vitamini analizi floresans spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. B₁ vitamini analizi için floresans spektrofotometreye ait ölçüm parametreleri; eksitasyon dalgaboyu: 348 nm, emisyon dalgaboyu: 455 nm, eksitasyon slit aralığı: 5 nm, emisyon slit aralığı: 5 nm, PMT voltajı ise 600 mV'dir.

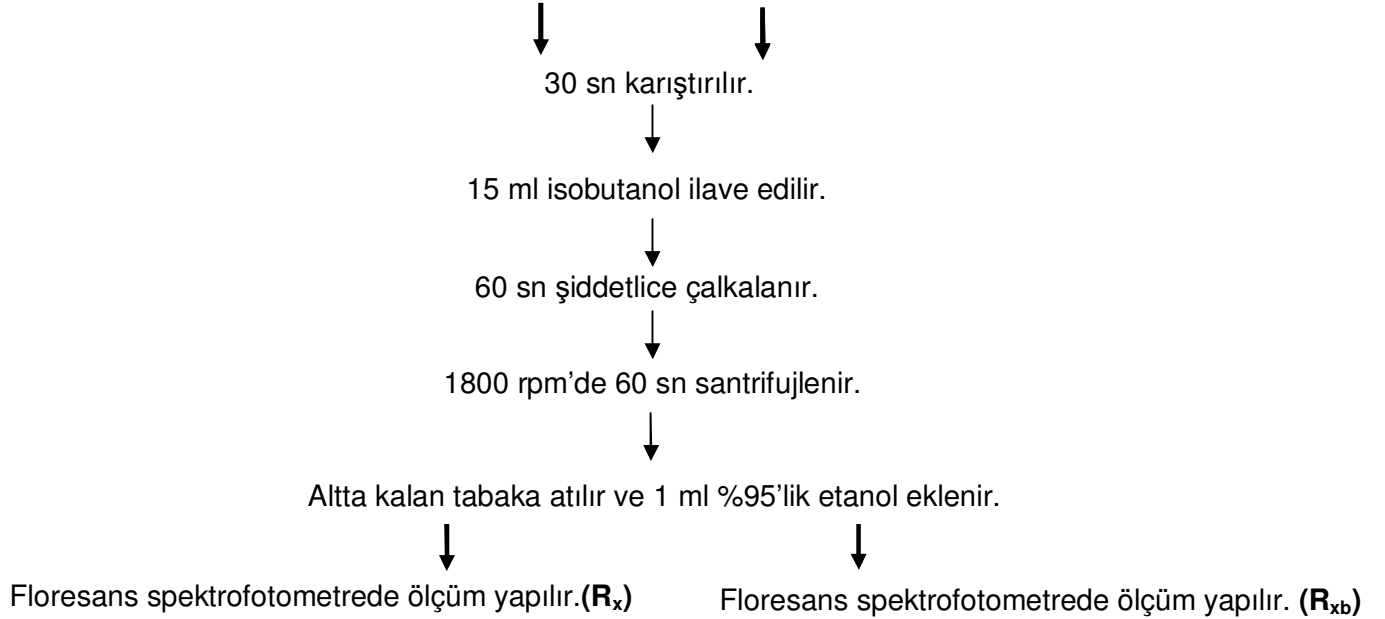
Ekmek örneklerinin ekstraktlarından B₁ vitaminin analizi için örnek ve kör için reaksiyonlar gerçekleştirilmiş ve B₁ vitamini miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.12).

Örnek

5 ml ekstrakt üzerine 3 ml alkali potasyum ferrisiyanit çözeltisi ilave edilir.

Kör

5 ml ekstrakt üzerine 3 ml %15'lik NaOH çözeltisi ilave edilir.



Şekil 3.12. B₁ vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-80 (AACC, 2000)'ye göre belirlenmesi.

$$\text{Tiamin (mg/kg)} = \frac{R_x - R_{xb}}{R_s - R_{sb}} \times \frac{V}{X} \times \frac{C}{S}$$

R_x : Örnek için floresans değeri

R_{xb} : Örnek için floresans kör değeri

R_s : B₁ vitamini standardı için floresans değeri

R_{sb} : B₁ vitamini standardı için kör değeri

V : Ekstrakt hacmi (50 mL)

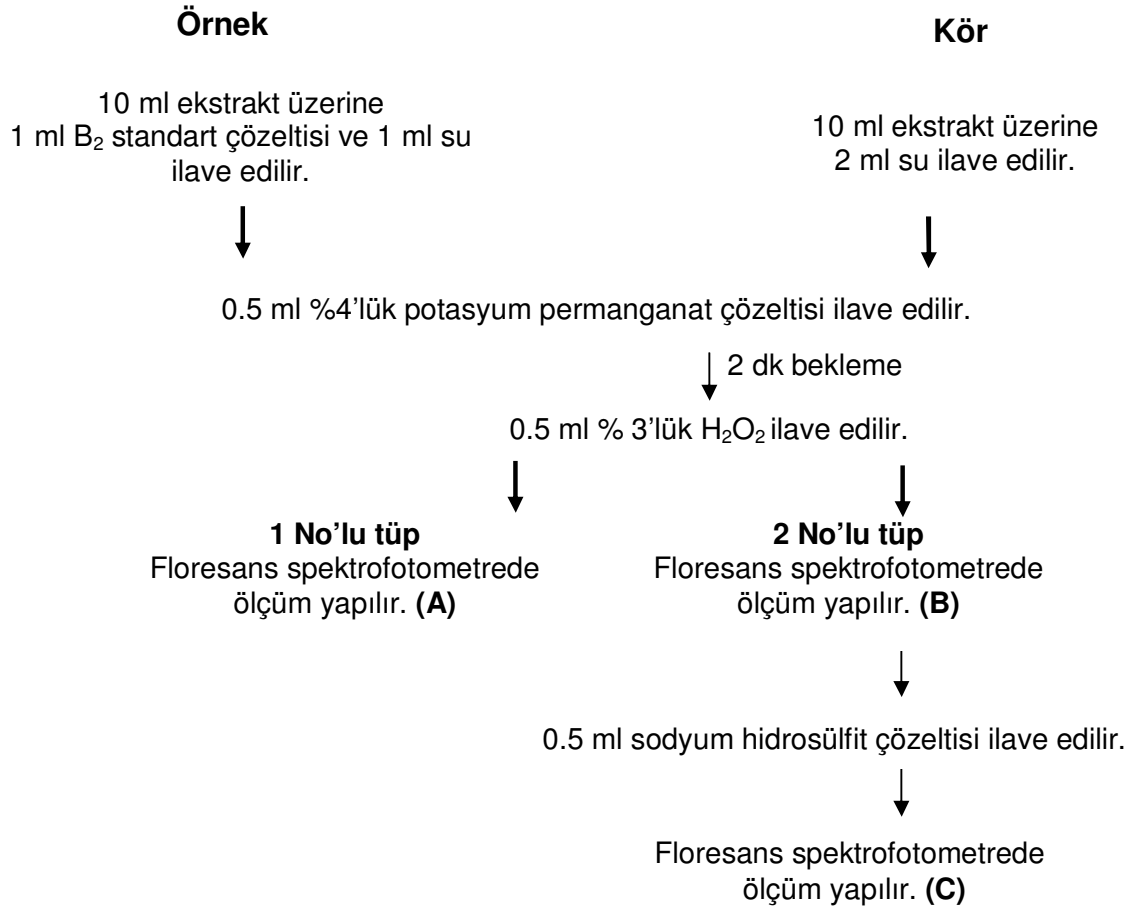
X : Reaksiyon için kullanılan örnek hacminin standart hacmine oranı (1)

C : Standart derişimi (önerilen değer: 0.2 µg/ml)

S : Örnek miktarı (g)

B₂ Vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-70'e göre belirlenmesi

Ekmek örneklerindeki B₂ vitamini miktarı AACC Metot No. 86-70 (AACC, 2000)'e göre florometrik olarak aşağıdaki koşullarda belirlenmiştir (Şekil 3.13). B₂ vitamini analizi için floresans spektrofotometreye ait ölçüm parametreleri; eksitasyon dalgaboyu: 440 nm, emisyon dalgaboyu: 565 nm, eksitasyon slit aralığı: 5 nm, emisyon slit aralığı: 20 nm, PMT voltajı ise 600 mV'dir.



Şekil 3.13. B₂ vitamini miktarının AACC Metodu No. 86-70 (AACC, 2000)'e göre belirlenmesi

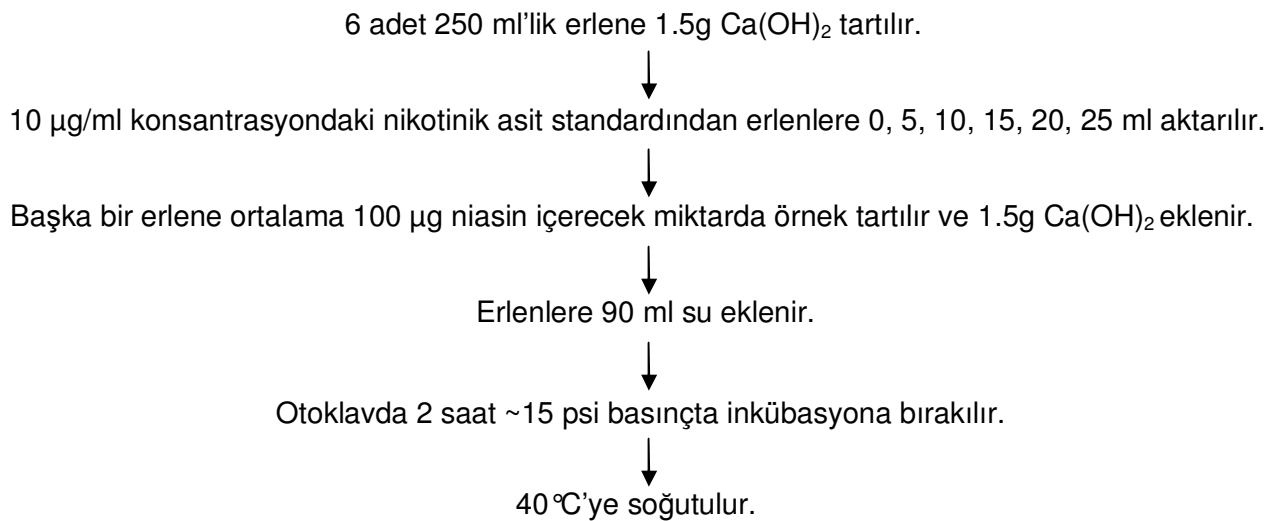
Ölçüm sonrasında elde edilen değerler aşağıdaki formülde kullanılarak ekmek örneklerindeki riboflavin miktarları hesaplanmıştır.

$$\text{Riboflavin (mg/kg)} = \frac{B - C}{A - B} \times \frac{R}{S} \times \frac{V}{V_1}$$

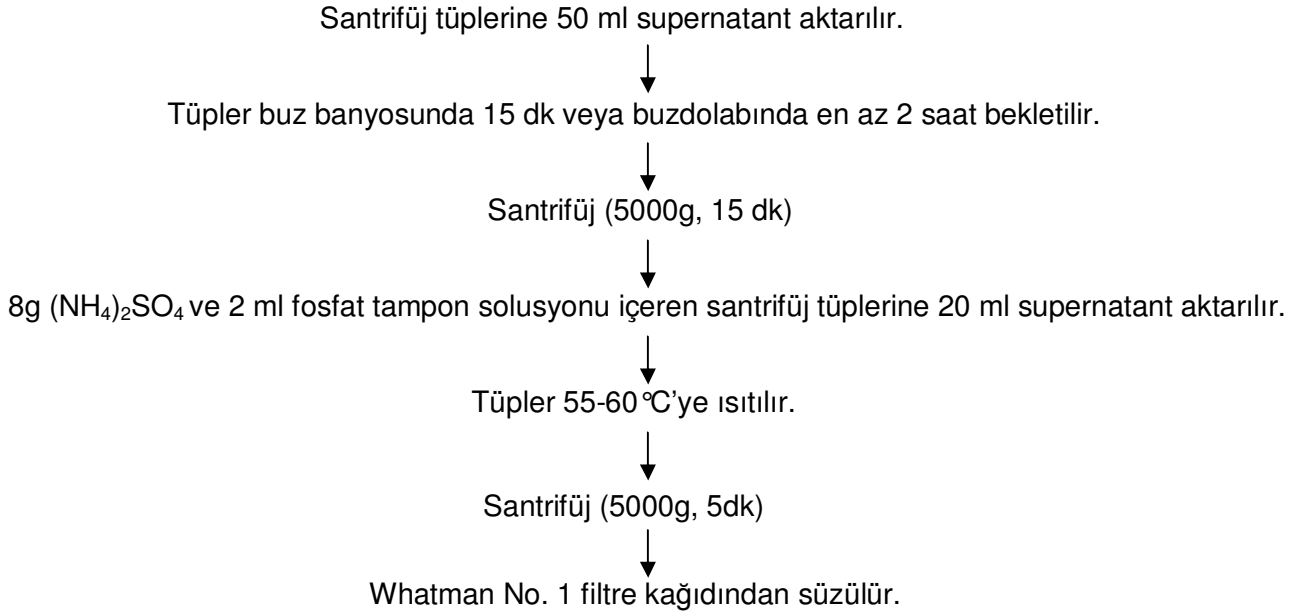
- A** : Standart içeren örnekler için ölçülen floresans değeri
B : Su içeren örnekler için ölçülen floresans değeri
C : Sodyum hidrosülfid ilavesinden sonra ölçülen floresans değeri
R : Örneğe ilave edilen standart riboflavin miktarı ($\mu\text{g}/V_1$)
V : Örnek çözeltisinin orjinal hacmi (ml)
V₁ : Örnek için kullanılan örnek hacmi (ml)
S : Örnek miktarı (g)

Niasin miktarının AACC Metodu No. 86-50A'ya göre belirlenmesi

Ekmek örneklerinin niasin içerikleri AACC Metodu No. 86-50A (AACC, 2000)'e göre hidroliz (Şekil 3.14), klarifikasyon (Şekil 3.15) ve renk gelişimi (Şekil 3.16) olmak üzere üç aşamalı prosedür ile belirlenmiştir. Bu metotta niasin kolorimetrik teknik ile kimyasal olarak belirlenmektedir. Öğütülmüş örnek alkali ortamda ekstrakte edilmekte ve sulfanilik asit ve siyanojen bromür ile reaksiyona girerek sarı renk oluşturmaktadır. Konig reaksiyonunun prensibini kullanan bu metotta sulfanilik asit ile reaksiyon öncesinde niasin molekülünün piridin grubu siyanojen bromür tarafından kırılmaktadır.

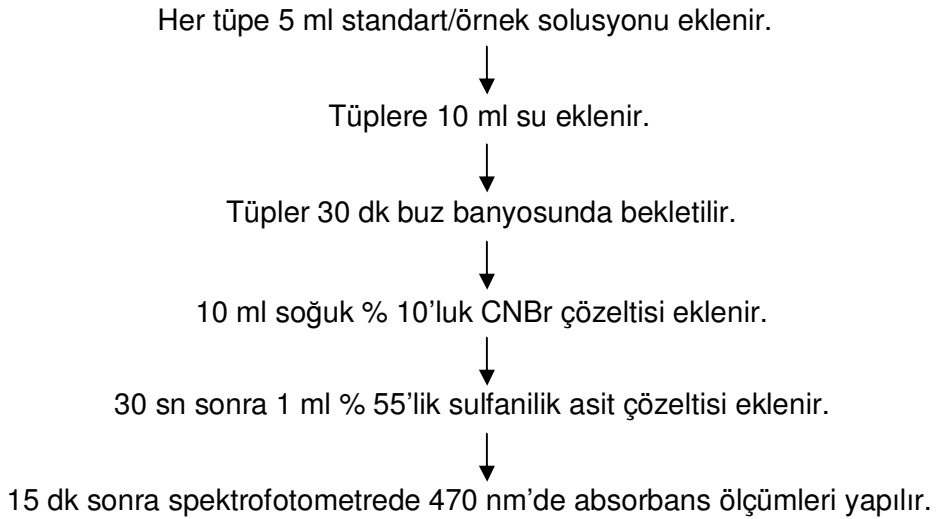


Şekil 3.14. Niasinin belirlenmesindeki 1. aşama: hidroliz (AACC Metodu No. 86-50A).



Şekil 3.15. Niasinin belirlenmesindeki 2. aşama: klarifikasyon (AACC Metodu No. 86-50A).

Niasinin belirlenmesindeki 3. aşama olan renk gelişimi aşamasında standart kör için bir adet daha tüp kullanılmış ve bu tüpe siyanojen bromür eklenmemiştir.



Şekil 3.16. Niasinin belirlenmesindeki 3. aşama: renk gelişimi (AACC Metodu No. 86-50A).

Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak örneklerin niasin miktarları hesaplanmıştır.

$$\text{Nikotinic asit (mg/100g örnek) = } \frac{C}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 10$$

C: Örnek absorbansına karşılık gelen konsantrasyon değeri

3.4.6. Araştırma sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Araştırma sonuçları SPSS 13.0 for Windows istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklar önemli bulunduğu ortalamalar Duncan testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İkili karşılaştırmalar (HPLC ve AACC metotlarının sonuçları) t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Un Örneğinin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Farinogram Özellikleri

Çalışma kapsamında ticari buğday unu kullanılmış olup ekmek üretimi öncesinde una ait kimyasal ve fiziksel özellikler saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Buğday ununa ait kimyasal ve fizikokimyasal özellikler.

Rutubet (%)	10.9±0.14
Protein (%) ^{1,2}	12.4±0.02
Kül (%) ²	0.68±0.03
Yaş gluten miktarı (%) ³	33.2±0.21
Kuru gluten miktarı (%) ³	10.7±0.02
Zeleny sedimentasyon değeri (ml) ³	32.6±1.06
Modifiye sedimentasyon değeri (ml) ³	26.1±1.41

Değerler iki tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

¹N x 5.7

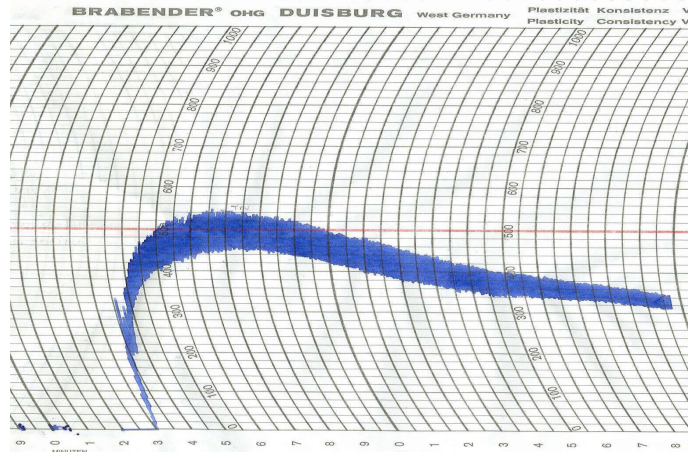
²Kurumadde esasına göre

³% 14 nem esasına göre

Un örneğinin farinogramı Şekil 4.1’de, farinogram özellikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Un örneğinin kalite özellikleri genel olarak incelendiğinde, orta kalitede buğday unu karakteristiklerine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Un örneğinin farinogram özellikleri.

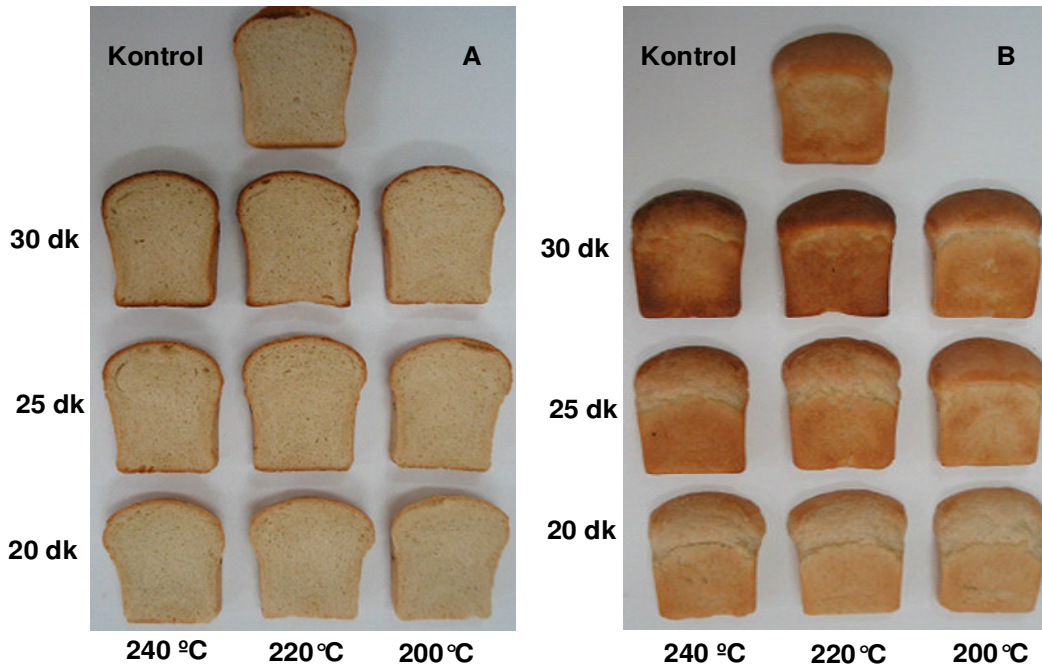
Su absorpsiyonu (%)	62
Gelişme süresi (dakika)	4.0
Stabilite (dakika)	5.0
Yoğurma tolerans sayısı (B.U)	80
Yumuşama derecesi (B.U)	160



Şekil 4.1. Buğday ununa ait farinogram.

4.2. Ekmek Örneklerinin Kalite Özelliklerinin İncelenmesi

Farklı fırın sıcaklıkları ve pişme sürelerinde üretilen ekmeklerin iç ve dış görünüşleri Şekil 4.2'de ve Ek 1'de verilmiştir. Ekmek örneklerinin renk özellikleri üst kabuk, yan kabuk ve ekmek içi kısımlarında incelenmiştir. Ayrıca ekmeklerin hacmi, gözenek yapısı, ekmek içi rengi ve yumuşaklık değerleri saptanmıştır.



Şekil 4.2. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmekler (A: İç, B: Kabuk) (Kontrol ekmeği: vitamin katkısız, 220 °C'de 25 dk pişirilmiştir.).

4.2.1. Ekmek örneklerinin renk değerleri

Ekmek örneklerinin renk değerlerinin kantitatif olarak saptanması için üst kabuk, yan kabuk ve iç kısımlarında spektrofotometrik olarak renk değerleri ölçülmüştür. Ekmek örneklerine ait Hunter renk değerleri (L^* , a^* , b^*) Çizelge 4.3'te görülmektedir. L^* değerindeki azalma ekmek renginin parlaklığının azaldığını, a^* değerindeki azalma ekmek renginin kırmızılığının azaldığını, b^* değerindeki azalma ise sarılık değerinin azaldığını ifade etmektedir. Renk değerlerindeki değişim üzerine pişme parametrelerinin etkilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi amacıyla pişme sıcaklığına ve süresine göre değişimler Çizelge 4.4-4.8'de ayrıca değerlendirilmiştir.

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin L^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Fırın sıcaklığının artması ile her üç pişme süresinde de üst kabuk L^* değerlerinde azalma saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. 25 dakika pişme süresinde vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait üst kabuk L^* değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin L^* değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı saptanmıştır. Diğer taraftan 25 dk pişme süresinde farklı fırın sıcaklıklarında (200 °C ve 240 °C) elde edilen ekmeklerde vitamin katkısız ekmeğe göre fark gözlenmiştir.

Fırın sıcaklığının artması ile her üç pişme süresinde de yan kabuk L^* değerlerinde azalma saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Ekmek örneklerinin yan kabuk L^* değeri 20 dk pişme süresinde sıcaklık artışına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Yan kabukta 25 dk'da 240 °C'de elde edilen L^* değeri, 200 ve 220 °C'de elde edilen değere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Ekmek örneklerinde 30 dk pişme süresinde ise 240 ve 220 °C'de yan kabukta elde edilen L^* değerleri, 200 °C'de elde edilen değere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır.

Çizelge 4.3. Farklı proses koşullarında üretilen ekmeklerin renk değerleri.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Kısım	L^*	a^*	b^*
200	20	Üst kabuk	72.08±1.28	4.72±1.76	25.10±2.45
		Yan kabuk	68.15±1.33	4.88±0.82	28.66±2.40
		İç	67.11±1.63	-0.37±0.13	17.83±0.65
	25	Üst kabuk	71.02±1.90	8.16±2.31	27.12±0.37
		Yan kabuk	66.93±1.46	4.86±0.35	26.51±2.92
		İç	68.61±2.49	-0.37±0.32	17.65±1.85
	30	Üst kabuk	66.07±1.36	6.84±1.70	27.44±1.50
		Yan kabuk	64.68±2.03	6.54±1.00	28.87±0.42
		İç	69.21±2.11	-0.46±0.30	17.48±1.54
220	20	Üst kabuk	61.98±0.22	13.04±1.05	30.68±3.49
		Yan kabuk	62.26±1.74	9.74±1.85	31.24±3.83
		İç	68.04±1.64	-0.36±0.15	17.61±0.99
	25	Üst kabuk	58.14±0.74	12.81±0.95	30.6±1.74
		Yan kabuk	65.04±0.15	9.38±1.65	30.78±1.49
		İç	67.76±1.03	-0.36±0.06	18.06±0.81
	30	Üst kabuk	56.48±2.61	13.74±0.11	30.02±3.39
		Yan kabuk	57.74±2.58	12.34±1.35	32.86±0.54
		İç	67.51±1.85	-0.29±0.19	17.60±0.77
240	20	Üst kabuk	54.12±2.18	14.15±0.05	26.32±2.48
		Yan kabuk	57.34±1.11	12.30±2.87	31.26±2.33
		İç	68.13±2.08	-0.45±0.25	16.86±1.17
	25	Üst kabuk	50.20±1.30	14.06±2.02	22.16±2.69
		Yan kabuk	57.68±2.41	13.82±2.34	34.26±0.21
		İç	68.49±0.56	-0.40±0.09	17.55±0.91
	30	Üst kabuk	40.28±0.36	12.70±0.37	19.42±0.65
		Yan kabuk	52.36±0.19	12.84±1.73	33.22±1.92
		İç	67.90±1.87	-0.31±0.18	17.29±0.98
220 (KONTROL)	25	Üst kabuk	56.90±1.73	12.24±1.79	30.4±1.92
		Yan kabuk	65.58±0.98	10.31±1.68	32.18±2.45
		İç	67.45±2.86	-0.07±0.18	15.55±1.72

L^* : parlaklık; a^* : kırmızılık; b^* : sarılık

Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin L^* renk değeri üzerine etkisi.

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
20	200	72.08±1.28a	68.15±1.33a	67.11±1.63a
	220	61.98±0.22b	62.26±1.74b	68.04±1.64a
	240	54.12±2.18c	57.34±1.11c	68.13±2.08a
25	200	71.02±1.90a	66.93±1.46a	68.61±2.49a
	220	58.14±0.74b	65.04±0.15a	67.76±1.03a
	240	50.20±1.30c	57.68±2.41b	68.49±0.56a
25	220 (Kontrol)	56.90±1.73b	65.60±0.98a	67.45±2.86a
30	200	66.07±1.36a	64.68±2.03a	69.21±2.11a
	220	56.48±2.61b	57.74±2.58b	67.51±1.85a
	240	40.28±0.36c	52.36±0.19b	67.9±1.87a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Fırın sıcaklığının artması ile her üç pişme süresinde elde edilen ekmek örneklerine ait ekmek içi L^* değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) saptanmamıştır.

Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin L^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.5'te görülmektedir. Her üç fırın sıcaklığında pişme süresinin artması ile üretilen ekmeklerde üst kabuk L^* renk değerlerinde azalma saptanmıştır. Pişme süresinin 30 dk'ya çıkması ile her üç fırın sıcaklığında da elde edilen üst kabuk L^* renk değerleri istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır.

Yan kabuk L^* renk değerleri incelendiğinde ise 200 °C'de üretilen ekmeklerde pişme süresi değişimine göre istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Ekmek örneklerinde 220 °C ve 240 °C' de 30 dk pişme süresinde elde edilen yan kabuk L^* değerindeki azalma istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 4.5. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin L^* renk değeri üzerine etkisi

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
200	20	72.08±1.28a	68.15±1.33a	67.11±1.63a
	25	71.00±1.90a	66.93±1.46a	68.61±2.49a
	30	66.07±1.36b	64.68±2.03a	69.21±2.11a
220	20	61.98±0.22a	62.26±1.74ab	68.04±1.64a
	25	58.14±0.74ab	65.04±0.15a	67.76±1.03a
	30	56.48±2.61b	57.74±2.58b	67.51±1.85a
220	25 (Kontrol)	56.90±1.73b	65.60±0.98a	67.45±2.86a
240	20	54.12±2.18a	57.34±1.11a	68.13±2.08a
	25	50.20±1.30a	57.68±2.41a	68.49±0.56a
	30	40.28±0.36b	52.36±0.19b	67.9±1.87a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Pişme süresinin artması ile her üç fırın sıcaklığında elde edilen ekmek örneklerine ait ekmek içi L^* değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) saptanmamıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, vitamin içermeyen kontrol örneğine ait ekmeklerin üst kabuk, yan kabuk ve ekmek içi bölümlerinin L^* renk değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin L^* değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.5). Bu durum vitamin ilavesinin ekmeğin parlaklık değeri üzerine etkisinin olmadığı fikrini vermektedir.

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin a^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.6'da görülmektedir. Her üç pişme süresinde de fırın sıcaklığının artması ile üst kabuk ve yan kabuk a^* renk değerlerinde artma saptanmış ve bu artış istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Genel olarak üst kabuk değerleri incelendiğinde 200°C'de elde edilen a^* renk değerlerinin 220°C ve 240°C'de elde

edilen değerlere göre önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Her üç pişme süresinde de 240°C'de pişirilen ekmeklerde yan kabuk a^* renk değerleri 200°C'de pişirilenlere göre önemli ölçüde artmıştır. Fırın sıcaklığının artması ile 20 ve 30 dk pişme süresinde elde edilen ekmek örneklerine ait ekmek içi a^* renk değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) saptanmamıştır.

Genel olarak, 25 dakika pişme süresinde vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait ekmeklerin üst kabuk ve yan kabuk bölümlerinin a^* renk değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin a^* renk değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Ekmek içi değerleri incelendiğinde ise vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait a^* renk değeri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin a^* renk değeri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.6. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin a^* renk değeri üzerine etkisi

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
20	200	4.72±1.76b	4.88±0.82b	-0.37±0.13a
	220	13.04±1.05a	9.74±1.85ab	-0.36±0.15a
	240	14.15±0.05a	12.3±2.87a	-0.45±0.25a
25	200	8.16±1.62b	4.86±0.35b	-0.37±0.32b
	220	12.81±0.95a	9.38±1.65ab	-0.36±0.06b
	240	14.06±2.02a	13.82±2.34a	-0.40±0.09b
25	220 (Kontrol)	12.24±1.22a	10.31±1.68a	-0.07±0.18a
30	200	6.84±1.70b	6.54±1.00b	-0.46±0.30a
	220	13.74±0.11a	12.34±1.35a	-0.29±0.19a
	240	12.70±0.37a	12.84±1.73a	-0.31±0.18a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin a^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.7'de görülmektedir. Çalışılan her üç sıcaklık değerinde üretilen ekmeklerin üst kabuk, yan kabuk ve ekmek içi a^* renk değerleri arasında pişme sürelerindeki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Bu durum ekmeğin kırmızılığının artmasında sıcaklığın belirleyici faktör olduğunu ifade etmektedir.

Üst ve yan kabuk değerleri incelendiğinde, vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait a^* renk değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin a^* renk değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı da saptanmıştır. Bununla birlikte vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait a^* renk değeri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin a^* renk değeri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum vitamin katkısının ekmeklerde kırmızılığın göstergesi olan a^* renk değeri üzerinde etkili olduğu fikrini vermektedir.

Çizelge 4.7. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin a^* renk değeri üzerine etkisi

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
200	20	4.72±1.76a	4.88±0.82a	-0.37±0.13a
	25	8.16±1.62a	4.86±0.35a	-0.37±0.32a
	30	6.84±1.70a	6.54±1.00a	-0.46±0.30a
220	20	13.04±1.05a	9.74±1.85a	-0.36±0.15b
	25	12.81±0.95a	9.38±1.65a	-0.36±0.06b
	30	13.74±0.11a	12.34±1.35a	-0.29±0.19b
220	25 (Kontrol)	12.24±1.22a	10.3±1.68a	-0.07±0.18a
240	20	14.15±0.05a	12.30±2.87a	-0.45±0.25a
	25	14.06±2.02a	13.82±2.34a	-0.40±0.09a
	30	12.70±0.37a	12.84±1.73a	-0.31±0.18a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin b^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.8'de görülmektedir. 20 dk pişme süresinde üretilen ekmeklerde farklı fırın sıcaklıklarında üst kabuk, yan kabuk ve ekmek içi elde edilen b^* renk değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. 25 dk ve 30 dk pişme süresinde elde edilen üst kabuk b^* renk değerleri incelendiğinde ise 240°C'de elde edilen değerlerin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$).

25 dk pişme süresinde elde edilen yan kabuk değerleri incelendiğinde farklı fırın sıcaklıkları arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir. Bununla beraber, 30 dk pişme süresinde 200°C'de elde edilen b^* renk değerinin 220 ve 240°C'de elde edilen değerlere göre önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Her üç pişme süresinde de fırın sıcaklığının vitamin katkılı ekmek örneklerinin ekmek içi b^* renk değerlerine istatistiksel olarak önemli etkisi saptanmamıştır.

Vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait b^* renk değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin b^* renk değerleri arasında üst ve yan kabukta istatistiksel olarak bir fark bulunmazken ekmek içi değerleri açısından önemli fark saptanmıştır. Bu durum vitamin katkısının ekmek içi sarılığını beklenildiği gibi arttırdığını göstermektedir.

Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin b^* renk değeri üzerine etkisi Çizelge 4.9'da görülmektedir. Çalışmada 200°C ve 220°C sıcaklık değerinde üretilen ekmeklerin üst kabuk b^* renk değerleri arasında pişme sürelerindeki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, 240°C'de 30 dk pişme süresinde elde edilen üst kabuk b^* renk değerinin 20 dk pişme süresinde elde edilen değere göre önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$).

Çalışılan her üç sıcaklık değerinde üretilen vitamin katkılı ekmeklerin yan kabuk ve ekmek içi b^* renk değerleri arasında pişme sürelerindeki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.8. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin b^* renk değeri üzerine etkisi

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
20	200	25.1±2.45a	28.66±2.40a	17.83±0.65a
	220	30.68±3.49a	31.24±3.83a	17.61±0.99a
	240	26.32±2.48a	31.26±2.33a	16.86±1.17a
25	200	27.12±0.37ab	26.51±2.92a	17.65±1.85a
	220	30.60±1.74a	30.77±1.49a	18.06±0.81a
	240	22.16±2.69b	34.26±0.21a	17.55±0.91a
25	220 (Kontrol)	30.40±1.92a	32.18±2.45a	15.55±1.72b
30	200	27.44±1.50a	28.87±0.42b	17.48±1.54a
	220	30.02±3.39a	32.86±0.54a	17.60±0.77a
	240	19.42±0.65b	33.22±1.92a	17.29±0.98a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Vitamin içermeyen kontrol ekmeğine ait b^* renk değerleri ile aynı pişme süresi ve fırın sıcaklığına sahip vitamin katkılı ekmeğin b^* değerleri arasında üst ve yan kabukta istatistiksel olarak bir fark bulunmazken ekmek içi değerleri açısından önemli fark saptanmıştır. Bu durum vitamin katkısının ekmek içi sarılığını arttırdığını göstermektedir.

4.2.2. Ekmek örneklerinin kalite özellikleri

Ekmek örneklerinin kalite özelliklerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Vitamin katkısız kontrol ekmeği, farklı proses koşullarında üretilen ekmekler ile gözenek yapısı açısından karşılaştırıldığında benzer olduğu gözlenmiştir. Vitamin katkısız kontrol ekmeğine göre farklı proses koşullarında üretilen vitamin katkılı ekmeklerin ekmek içi renk değerleri incelendiğinde ekmek içi sarılığının bir miktar arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar b^* renk değerleri sonuçlarını destekler niteliktedir. Yumuşaklık özelliği değerlendirildiğinde ise vitamin katkısız kontrol ekmeğine göre

Çizelge 4.9. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin ekmek örneklerinin b^* renk değeri üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Üst kabuk ¹	Yan kabuk ¹	Ekmek içi ¹
200	20	25.10±2.45a	28.66±2.40a	17.83±0.65a
	25	27.12±0.37a	26.51±2.92a	17.65±1.85a
	30	27.44±1.50a	28.87±0.42a	17.48±1.54a
220	20	30.68±3.49a	31.24±3.83a	17.61±0.99a
	25	30.6±1.74a	30.77±1.49a	18.06±0.81a
	30	30.02±3.39a	32.86±0.54a	17.60±0.77a
220	25 (Kontrol)	30.40±1.92a	32.18±2.45a	15.55±1.72b
240	20	26.32±2.48a	31.26±2.33a	16.86±1.17a
	25	22.16±2.69ab	34.26±0.21a	17.55±0.91a
	30	19.42±0.65b	33.22±1.92a	17.29±0.98a

¹Değerler üst kabuk ve yan kabukta iki, ekmek içinde beş tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

200°C'de üretilen ekmeklerin daha yumuşak olduğu, 220°C'de üretilen vitaminli ekmeklerin ise yumuşaklık özelliği bakımından benzer olduğu gözlenmiştir. 240°C'de üretilen vitamin katkılı ekmeklerin ise vitamin katkısız kontrol ekmeğine ve 200°C ve 220°C'de pişirilen vitamin katkılı ekmeklere göre daha sert olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle pişme süresinin artmasıyla beraber yumuşaklık değerinin azaldığı görülmüştür.

Genel olarak değerlendirildiğinde, vitamin ilavesinin ekmeğin incelenen genel kalite özelliklerini olumsuz etkilemediği, bununla beraber pişme süresinin artmasıyla yumuşaklık değerinin azaldığı görülmüştür. Benzer şekilde Rubin et al. (1977) ve Özkaya ve Özkaya (1999) da zenginleştirmenin ekmek kalitesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarında zenginleştirmenin ekmek kalitesini fazla etkilemediğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.10. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerin kalite özellikleri.

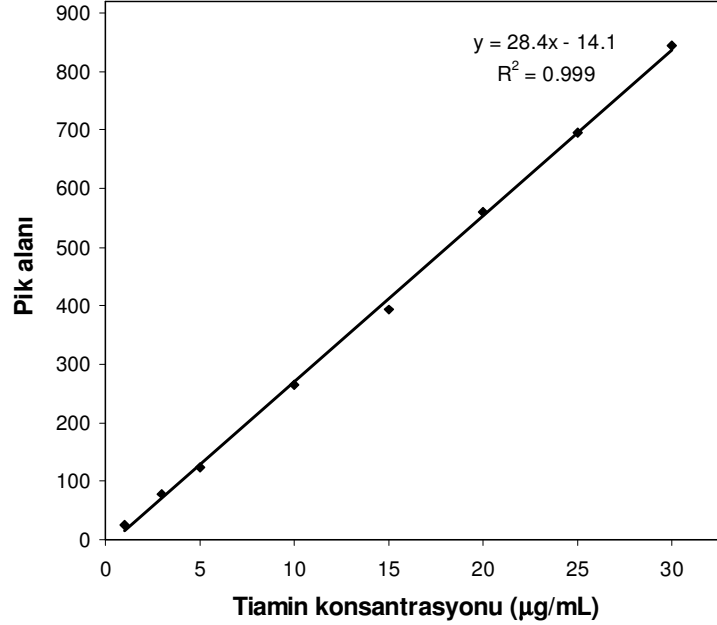
Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme süresi (dk)	Ekmek hacmi (cm ³)*	Gözenek yapısı (10)	Ekmek içi rengi (10)	Yumuşaklık (10)
220 (kontrol)	25	525±3.5	9	8	8.5
	20	578±3.5	9	9	9.5
200	25	560±14.1	9	9	9.5
	30	555±7.1	9	9	9.5
	20	540±21.2	9	9	8.5
220	25	530±14.1	9	9	8.0
	30	523±17.7	9	9	8.0
	20	543±17.7	9	9	8.0
240	25	523±17.7	9	9	7.5
	30	490±14.1	9	9	7.0

*Değerler iki tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

4.3. B Vitaminlerinin Analizleri

4.3.1. Ekmek örneklerinde tiamin ve riboflavin analizleri

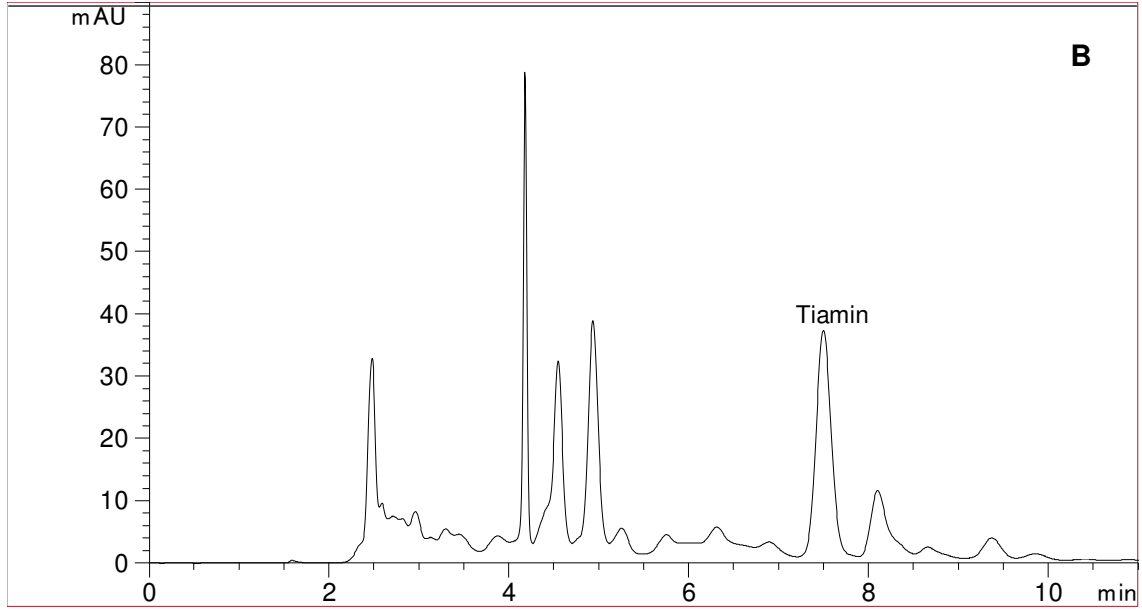
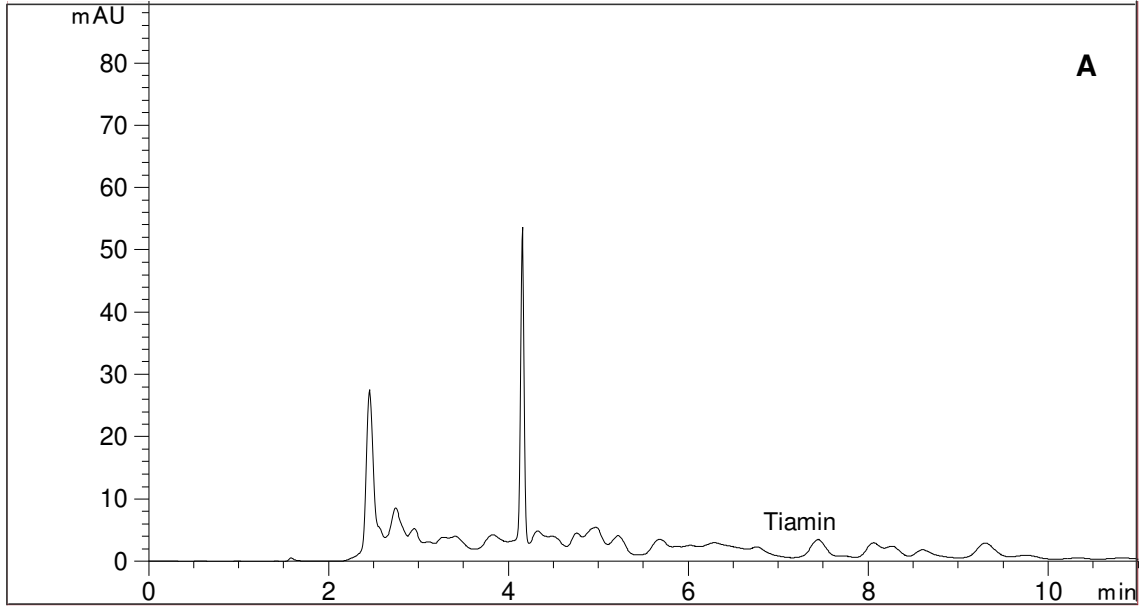
Tiamin ve riboflavin ile ilgili analizlere Erbaş et al. (2005)'un metodu ile başlanmıştır. İlk olarak mobil fazda hazırlanan tiamin stok çözeltisinden standart çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3). Kalibrasyon grafiğinin 1-30 ppm derişim aralığında lineer olduğu ($R^2=0.999$) saptanmıştır. Daha sonra normal ve zenginleştirilmiş ekmek örneklerinden suda çözünen vitaminlerin ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlardaki tiamin kromatogramları Şekil 4.4 A ve B'de verilmiştir.



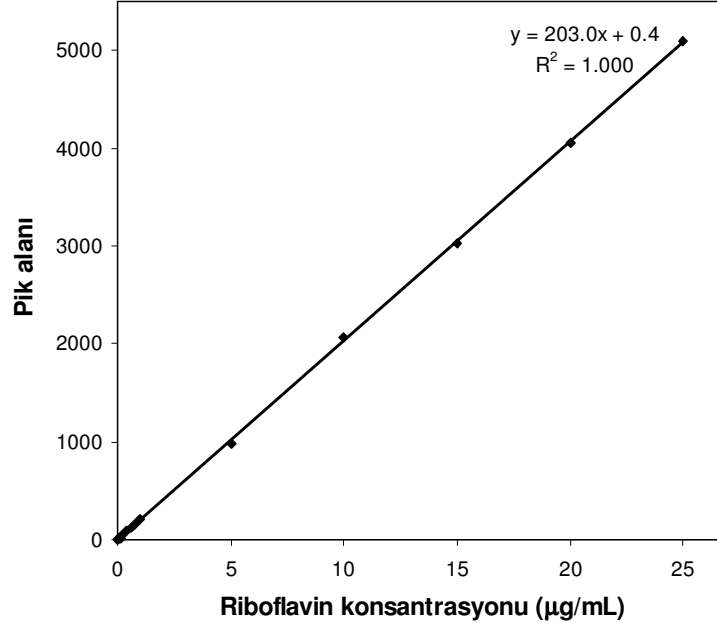
Şekil 4.3. Tiimin kalibrasyon grafiği (1-30 ppm). Mobil faz: İzokratik 50 mM KH_2PO_4 -asetonitril (95:5, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk.

Erbaş et al. (2005)'un metodunun uygulanması sonucunda elde edilen tiamin miktarları beklenen değerlerden oldukça yüksektir. Bu durumun çalışılan ekstraksiyon koşullarının örnek matriksinden tiimin ekstraksiyonu için yeterli olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

İkinci olarak Finglas and Faulks (1984)'un metodundaki metanol-su (30:70, v/v) mobil fazı kullanılarak kromatografik çalışmalara devam edilmiştir. Tiimin analizi ile ilgili çalışılan kromatografik koşullarda tiimin piki saptanamamıştır. Bunun üzerine riboflavin analizlerine geçilmiştir. Riboflavinin belirlenmesinin ardından kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.5). Kalibrasyon grafiğinin 0.02-25.00 ppm derişim aralığında doğrusal olduğu ($R^2=1.000$) saptanmıştır. Erbaş et al. (2005)'e göre elde edilmiş olan örnek ekstraktları metanol-su (30:70, v/v) mobil fazında denenmek üzere HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Normal ve zenginleştirilmiş ekmek örneğinin kromatogramı Şekil 4.6'da görülmektedir.



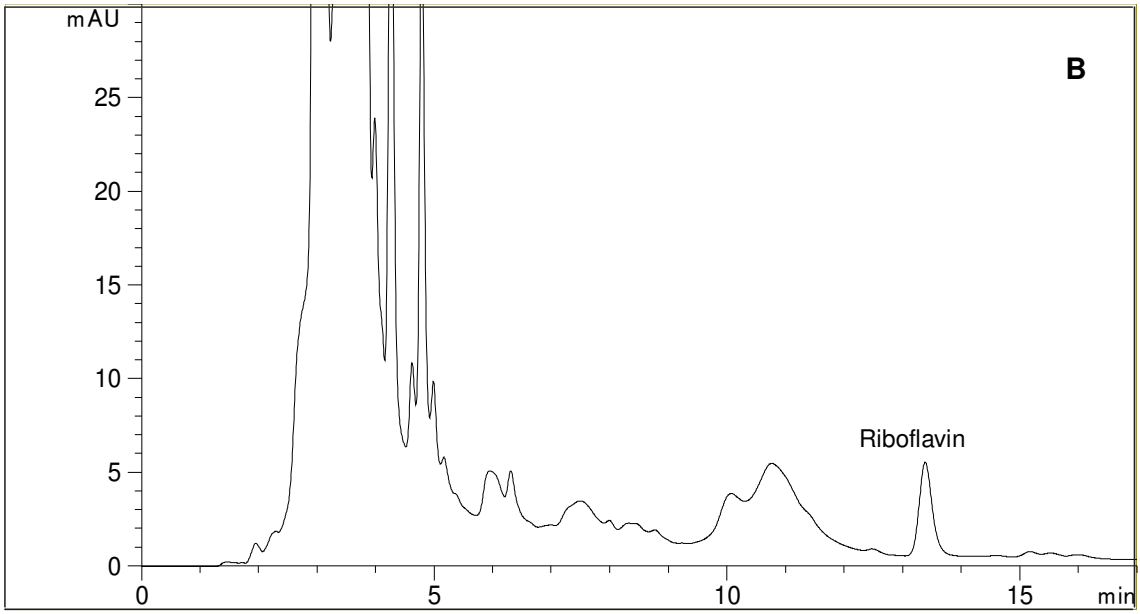
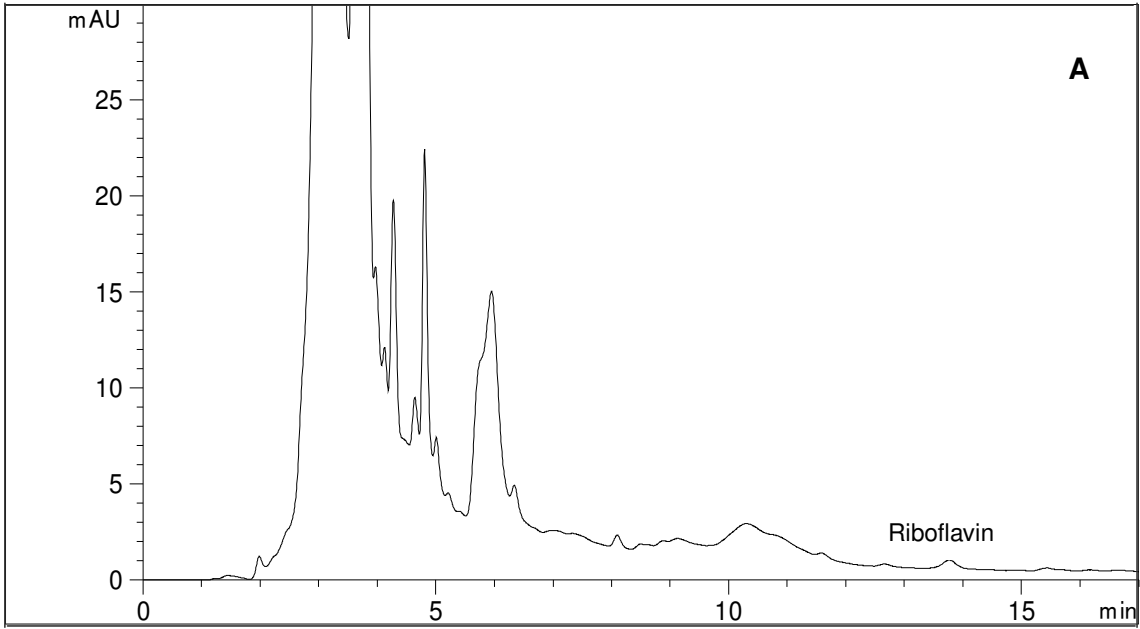
Şekil 4.4. Normal (A) ve zenginleştirilmiş (B) ekmek örneklerindeki tiamin kromatogramı. Mobil faz: İzokratik 50 mM KH_2PO_4 -asetonitril (95:5, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk.



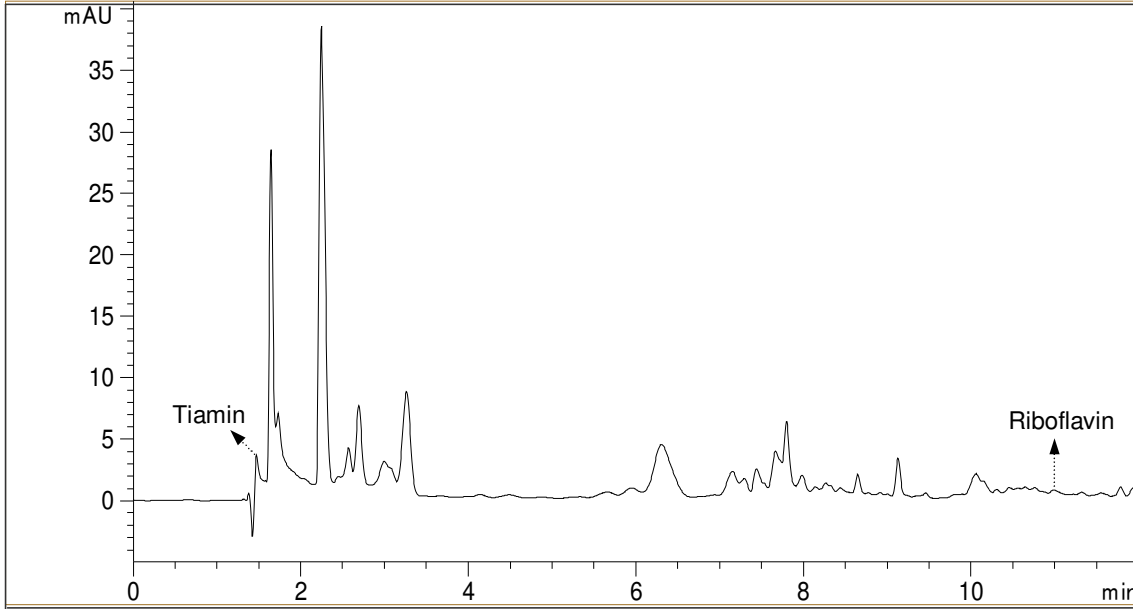
Şekil 4.5. Riboflavin kalibrasyon grafiği (0.02-25.00 ppm). Mobil faz: İzokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 0.5 ml/dk.

Normal ve zenginleştirilmiş ekmeğin örneklerinin analizi sonucunda elde edilen riboflavin miktarlarının örneklerde bulunması beklenen miktarlar ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Çalışılan yöntemin geri kazanma oranının % 98 olduğu belirlenmiştir. Fakat tiamin ve riboflavin analizlerinin birlikte yapılması amaçlandığı için bu yöntem kullanılmamıştır.

Üçüncü olarak Alltech (2005)'te belirtilen kromatografik koşullara göre çalışılmış ve tiamin ve riboflavin 254 nm'de belirlenmiştir. Ndaw et al. (2000) yöntemine göre normal ekmeğin örneğine ekstraksiyon uygulanmıştır. Daha sonra elde edilen normal ekmeğin ekstraktına katı faz ekstraksiyon (KFE) yöntemi (Cho et al., 2000; Ekinci, 2005) uygulanmıştır ve ekstrakt HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Katı faz ekstraksiyon yönteminde örnek polar çözücüde çözünmekte ve solusyon ters faz kartuşundan geçirilmektedir. Polar organik bileşenler yüzey üzerinden geçerken daha az polar olanlar yüzeye tutunmaktadır. Orta polaritede bir çözücü yüzeyde tutunan moleküllerden daha polar olan materyalleri yıkamak amacıyla kullanılmaktadır. Hidrofobik bileşenler yüzeyde bırakılacak şekilde daha az polar olan bir çözücüyle yıkılarak bir önceki çözelti uzaklaştırılmaktadır (Moreno and Salvado, 2000).



Şekil 4.6. Normal (A) ve zenginleştirilmiş (B) ekmekteki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: İzokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 0.5 ml/dk.

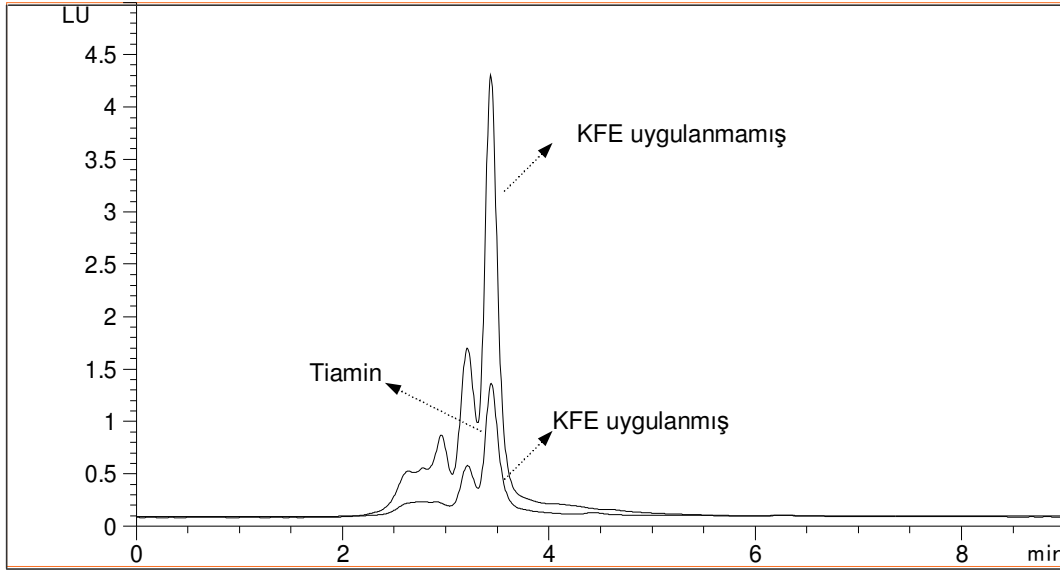


Şekil 4.7. Katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulaması sonucu elde edilen tiamin ve riboflavin kromatogramı. Mobil faz: 25 mM KH_2PO_4 (pH 3.0) (A) ve asetonitril (B) karışımı (gradyent). Akış hızı: 1 ml/dk.

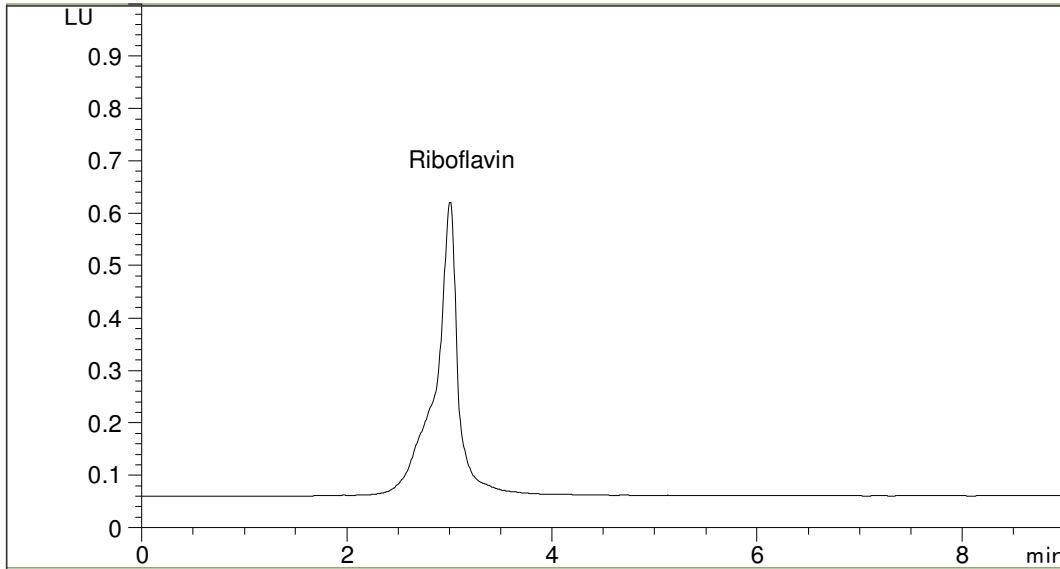
Katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulanarak yapılan çalışmalarda tiamin piki ayırımının iyi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). Bu sonuçlar ekmek ekstraktından tiaminin ekstraksiyonunun yeterli derecede sağlanamadığı veya kromatografik koşulların uygun olmadığı fikrini vermektedir. Diğer taraftan bu metot kullanılarak belirlenen riboflavin miktarının da beklenen değerin üzerinde olması nedeniyle çalışma koşullarının değiştirilmesine karar verilmiştir.

Diğer bir uygulamada Batifoulier et al. (2005) metoduna göre ekmek örneklerinden ekstraksiyon yapılarak aynı metoda göre kromatografik koşullar uygulanmıştır. Bu çalışmada tiamin pikinde iyi ayırım sağlanamamıştır. Bu nedenle bazı araştırmacıların tiamin analizinde girişim yapan bileşenlerin uzaklaştırılması için önerdikleri (Cho et al., 2000; Ekinci, 2005) katı faz ekstraksiyon yöntemi de uygulanmış ve örnek ekstraktları aynı kromatografik koşullarda incelenmiştir. Şekil 4.8'de KFE uygulanmış ve uygulanmamış örnek ekstraktlarının tiamin pikleri birlikte gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, KFE yönteminin kullanılmasının girişim yapan bazı bileşenleri uzaklaştırmakla beraber tiamin pikinde yeterli ayırımın elde edilemediğini göstermektedir. Bu yöntem kullanılarak elde edilen riboflavin kromatogramları

incelendiğinde ise çalışılan ekstraksiyon koşullarında riboflavinin ekmekten ayrımının daha kolay sağlanabildiği, fakat pik simetrisinin iyi olmadığı görülmüştür (Şekil 4.9). Bunun yanısıra riboflavin miktarının da beklenen değerin oldukça üzerinde olması nedeniyle başka metotlar üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir.



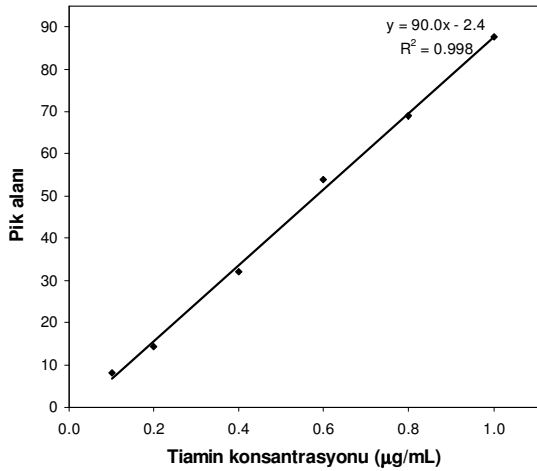
Şekil 4.8. Batifoulier et al (2005) metodundan elde edilen normal ekmek ekstraktına KFE uygulanmadan ve uygulandıktan sonraki tiamin kromatogramı. Mobil faz: 0.05M NaAc-Metanol (30/70; v/v, pH 6). Akış hızı: 1 ml/dk.



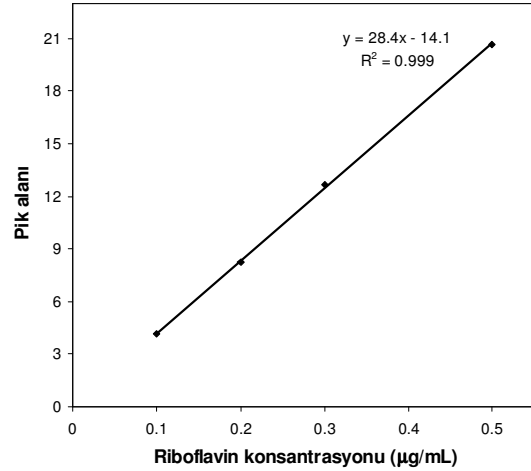
Şekil 4.9. Batifoulier et al (2005) metodundan elde edilen normal ekmek ekstraktındaki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: 0.05M NaAc-Metanol (30/70; v/v, pH 6). Akış hızı: 1 ml/dk.

Daha sonra ekmek örneklerinden tiamin ve riboflavinin ekstraksiyonu AACC Metodu No. 86-80 ve 86-70 (AACC, 2000)'ye göre gerçekleştirilmiştir. Kromatografik koşullar için Finglas and Faulks (1984)'un modifiye edilen metodu kullanılarak tiamin ve riboflavin miktarları HPLC ile belirlenmiştir. İlk olarak tiamin ve riboflavinin standart çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.10 ve 4.11). Tiamin için hazırlanan kalibrasyon grafiğinin 0.2-1.0 ppm konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve R^2 değerinin 0.999 olduğu belirlenmiştir. Riboflavin için kalibrasyon grafiği 0.1-0.5 ppm konsantrasyon aralığında üretilmiş olup R^2 değeri 1.000 olarak saptanmıştır. Zenginleştirilmiş ekmek örneklerinden elde edilen tiamin ve riboflavin kromatogramları Şekil 4.12 ve 4.13'te görülmektedir. Geri kazanım oranı tiamin için % 94, riboflavin için % 95 olarak saptanmıştır.

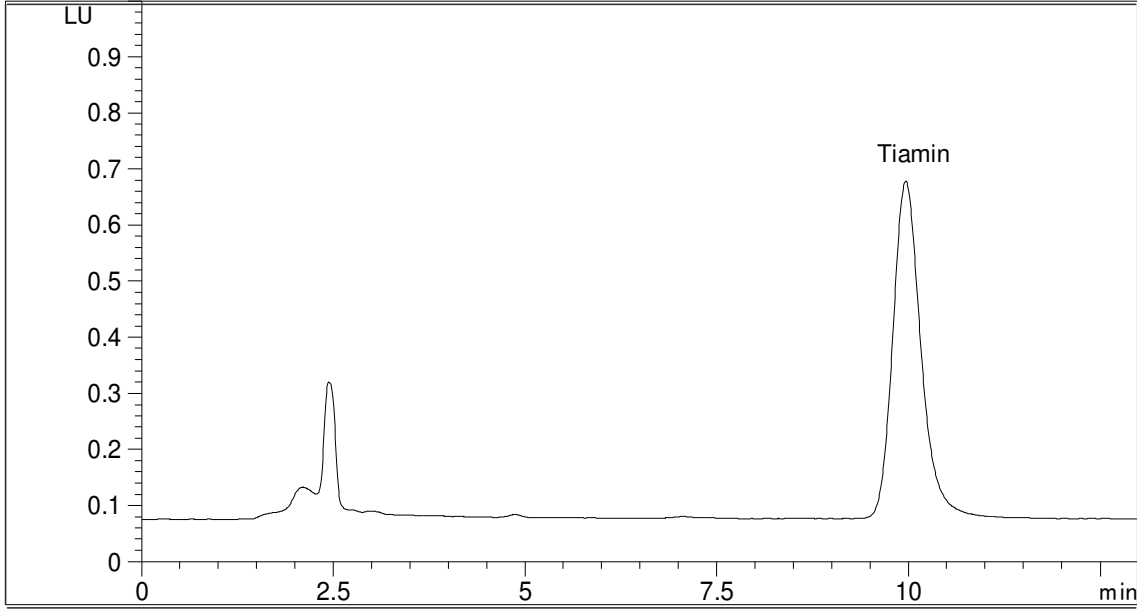
Sertifikalı referans materyali (süt tozu) içerisindeki tiamin miktarı (6.51 mg/kg) \pm % 7 kabul sınırları (ass. unc. %) içerisinde 6.21 mg/kg olarak saptanmıştır. Sertifikalı referans materyali (süt tozu) içerisindeki riboflavin miktarı (14.5 mg/kg) ise \pm % 4 kabul sınırları içerisinde 14.28 mg/kg olarak saptanmıştır.



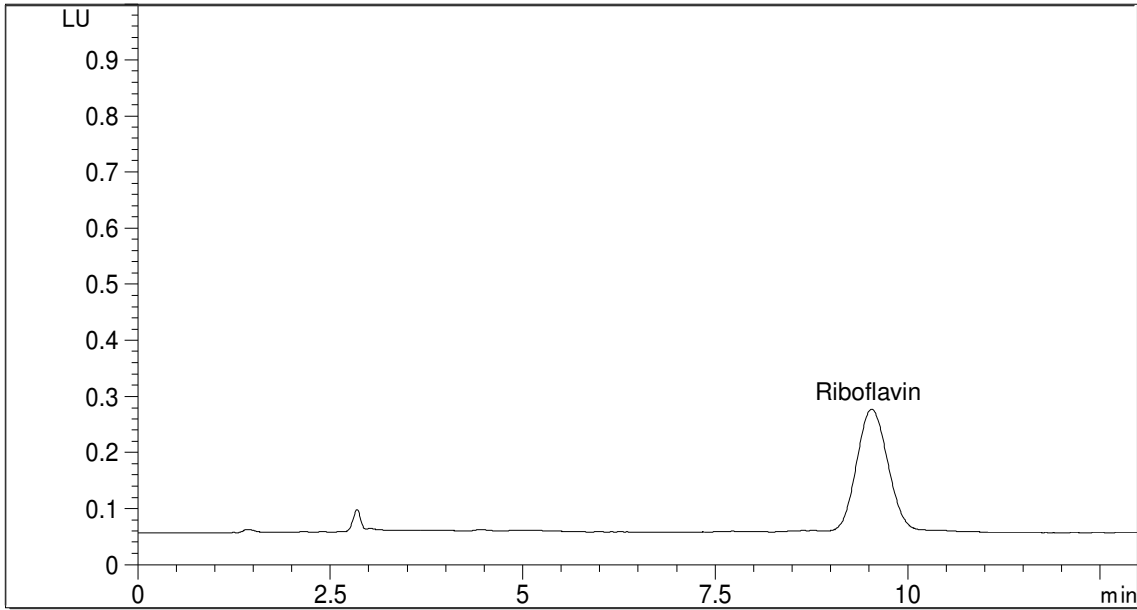
Şekil 4.10. Tiaminin kalibrasyon grafiği (0.1-1.0 ppm)



Şekil 4.11. Riboflavinin kalibrasyon grafiği (0.1-0.5 ppm)



Şekil 4.12. Finglas and Faulks (1984) yöntemine göre zenginleştirilmiş ekmekteki tiamin kromatogramı. Mobil faz: izokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk. μ Bondapak C18 ters faz kolonu (3.9 x 300 mm, 10 μ m).



Şekil 4.13. Finglas and Faulks (1984) yöntemine göre zenginleştirilmiş ekmekteki riboflavin kromatogramı. Mobil faz: izokratik metanol-su (30:70, v/v) karışımı. Akış hızı: 1 ml/dk. μ Bondapak C18 ters faz kolonu (3.9 x 300 mm, 10 μ m).

Ekmek örneklerinde tiamin ve riboflavin miktarlarının belirlenmesi amacıyla denenen çeşitli ekstraksiyon koşulları ve kromatografik koşullar birlikte değerlendirildiğinde ekmek örneklerinden tiamin ve riboflavinin ekstraksiyonu için AACC Metodu No. 86-80 ve 86-70 (AACC, 2000)'nin en iyi sonucu verdiği karar verilmiştir. Kromatografik olarak en iyi koşulların ise Finglas and Faulks (1984)'un metodunun modifiye edilerek elde edildiği saptanmıştır. Bu nedenle çalışma kapsamında incelenen ekmeklerin analizlerinde bu metotlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.11. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının tiamin miktarı üzerine etkisi.

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
20	200	14.41±0.08a	14.69±0.26a	13.67±0.20a
	220	12.31±0.10b	13.32±0.07b	11.23±0.16b
	240	11.99±0.09c	13.41±0.18b	9.88±0.11c
25	200	12.69±0.09a	13.79±0.21a	12.47±0.05a
	220	11.43±0.06c	12.97±0.20b	10.45±0.10b
	240	12.02±0.05b	13.11±0.06b	9.37±0.13c
30	200	12.45±0.08a	13.08±0.07a	12.13±0.15a
	220	11.39±0.04c	13.00±0.10a	10.02±0.09b
	240	12.02±0.03b	12.92±0.08a	9.88±0.24b

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmeklerin tiamin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.11'de görülmektedir. Çalışılan her üç pişme süresi değerinde de üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğu değerleri arasında genel olarak fırın sıcaklığındaki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli oranda azalma belirlenmiştir (p<0.05). Bununla birlikte, ekmek içi değerleri incelendiğinde 30 dk pişme süresinde farklı fırın sıcaklıklarının ekmeklerin tiamin miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir.

Farklı fırın sıcaklarında pişme süresinin ekmek örneklerindeki tiamin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çalışılan her üç pişme süresi değerinde de üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğu değerleri arasında pişme sürelerindeki artışa bağlı olarak azalma saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.12. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin tiamin miktarı üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
200	20	14.41±0.08a	14.69±0.26a	13.67±0.20a
	25	12.69±0.09b	13.79±0.21b	12.47±0.05b
	30	12.45±0.08c	13.08±0.07c	12.13±0.15c
220	20	12.31±0.10a	13.32±0.07a	11.23±0.16a
	25	11.43±0.06b	12.97±0.20b	10.45±0.10b
	30	11.39±0.04b	13.00±0.10b	10.02±0.09c
240	20	11.99±0.09a	13.41±0.18a	9.88±0.11a
	25	12.02±0.05a	13.11±0.06b	9.37±0.13b
	30	12.02±0.03a	12.92±0.08b	9.88±0.24a

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Genel olarak farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığındaki artış ile tiamin miktarının azaldığı görülmüştür. Artan fırın sıcaklığı ile tiamin değerlerindeki en belirgin azalma ekmek kabuğunda meydana gelmiştir. 200-240°C fırın sıcaklığı aralığında ekmek kabuğunda ortalama % 23.9 azalma gözlenirken, azalma oranı tüm ekmekte % 8.5, ekmek içinde ise % 5.1 ile sınırlı kalmıştır. Benzer şekilde ekmeğin kabuk ve iç kısımlarının incelendiği bazı çalışmalarda tiamin kaybının büyük bölümünün ekmeğin kabuk kısmında meydana geldiği belirtilmiştir (Schultz et al., 1942; Tabekhia and D'Appolonia, 1979). Tam buğday ekmeğinde kabuk kısmında iç kısma göre daha az tiamin bulunduğu belirtilmiştir (Maleki and Daghir, 1966).

Çalışma kapsamında incelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200 °C, 20 dk) ve maksimum (240 °C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmek tiamin değerleri arasında % 16.6'lık azalma olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.13. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen tiamin miktarları

Örnek	Tiamin (µg/g) ^{1,2}
Vitamin katkısız un	4.71±0.03
Vitamin katkılı hamur (2. fermentasyon) ³	12.99±0.34
Vitamin katkılı hamur (son fermentasyon) ³	14.40±0.29

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

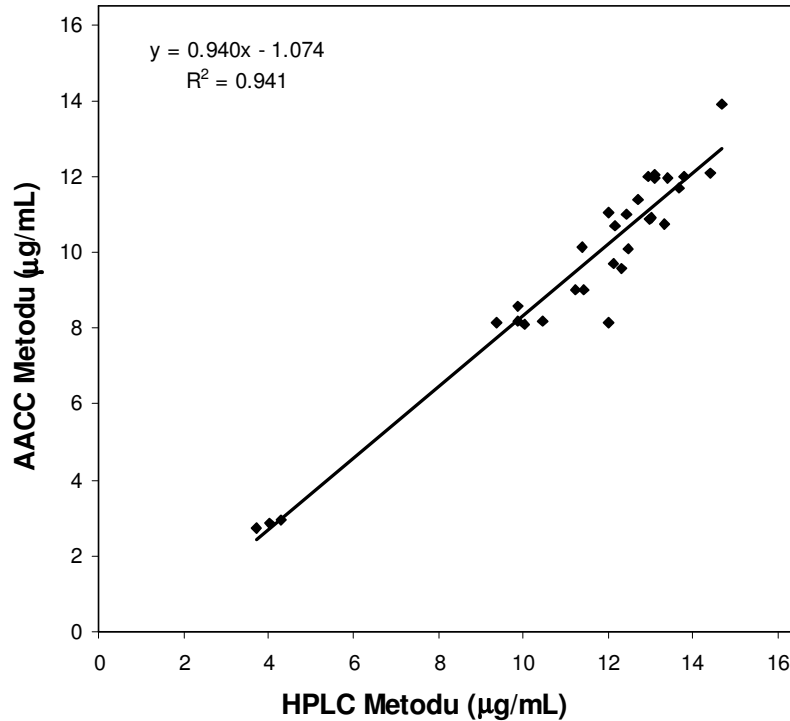
³Un örneğine 5.65 µg/g tiamin katılarak hazırlanmıştır.

Fırıncılık ürünlerinde sıcaklık, pişme süresi ve pH'nın tiamin ve piridoksin kaybına neden olan fiziksel faktörler olduğu ifade edilmektedir. Maya fermentasyonu ile ekmek yapım metodunun uygulandığı Batifoulie et al. (2005)'un çalışmasında 250 °C'de 20 dk pişme süresi ile gerçekleştirilen ekmek yapım prosesinde una göre % 37 oranında tiamin kaybı meydana geldiği bildirilmiştir. Ndaw et al. (2000) klasik ekmek yapım prosesi ile % 30'a varan oranda, Tanphaichitr (2001) ise % 5-35 oranında tiamin kaybı olabileceğini belirtmişlerdir. Coppock et al. (1957), 475 °F (246 °C) sıcaklıkta 30 dk pişme süresinde elde edilen ekmekte % 20 tiamin kaybı meydana geldiğini belirtmiştir (Maleki and Daghir, 1966). Bu çalışmada kontrol ekmeğinde (tüm ekmekte) belirlenen tiamin miktarının una göre % 14.8 oranında azaldığı saptanmıştır. Bu durum çalışmada elde edilen sonuçların literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Lásztity (1999) tarafından buğday unlarındaki tiamin miktarının 1.7-4.1 µg/g aralığında olduğu belirtilmiştir. Tabekhia and D'Appolonia (1979) çalışmalarında kullandıkları buğday unu örneğinde 4.7 µg/g tiamin bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen değer Tabekhia and D'Appolonia (1979) tarafından elde edilen değerle uyumludur.

Maleki and Daghir (1966), unu tiamin ile zenginleştirdikten sonra hamurda belirledikleri tiamin miktarının eklenen vitamin miktarına göre fazla olduğunu belirlemişler ve bu artışın fermentasyon sırasında maya hücrelerinin çoğalması ile açıklanabileceğini ifade etmişlerdir. Thorn and Ross (1960) ise doğrudan hamur yapma tekniği ile 3.0-3.5 saat fermente edilen hamurda % 35 oranında maya çoğalması olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada vitamin katkılı hamurda fermentasyon ile tiamin miktarında % 38.9 oranında artış meydana geldiği saptanmıştır (Çizelge 4.13). Batifoulier et al. (2005), uzun fermentasyon süresi ile maya tarafından tiamin sentezinin arttığını, bunun da pişme işlemi ile oluşan kayıpları telafi edebileceğini belirtmiştir.

Ekmek örneklerindeki tiamin miktarı HPLC ile belirlendikten sonra standart AACC Metodu No. 86-80 (AACC, 2000)'ye göre florometrik yöntemle de belirlenmiş ve sonuçlar t-testi ile karşılaştırılmıştır. HPLC ve AACC metodu ile ekmeklerde saptanan tiamin miktarları Şekil 4.14 ve Çizelge 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. B₁ vitamini analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması.

Çizelge 4.14. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-80) ile belirlenen tiamin miktarları.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Örnek	HPLC Metodu (µg/g) ^{1,2}	AACC Metodu (µg/g) ^{1,2}
200	20	Tüm ekmek	14.41±0.08	12.10±0.35
		Ekmek içi	14.69±0.26	13.90±0.64
		Ekmek kabuğu	13.67±0.20	11.68±0.23
	25	Tüm ekmek	12.69±0.09	11.39±0.38
		Ekmek içi	13.79±0.21	11.99±1.11
		Ekmek kabuğu	12.47±0.05	10.11±0.77
	30	Tüm ekmek	12.45±0.08	11.00±0.61
		Ekmek içi	13.08±0.07	11.97±0.16
		Ekmek kabuğu	12.13±0.15	9.68±0.27
220	20	Tüm ekmek	12.31±0.10	9.55±1.05
		Ekmek içi	13.32±0.07	10.73±0.70
		Ekmek kabuğu	11.23±0.16	9.02±0.15
	25	Tüm ekmek	11.43±0.06	8.99±1.50
		Ekmek içi	12.97±0.20	10.88±0.22
		Ekmek kabuğu	10.45±0.10	8.16±0.13
	30	Tüm ekmek	11.39±0.04	10.12±0.31
		Ekmek içi	13.00±0.10	10.93±0.19
		Ekmek kabuğu	10.02±0.09	8.10±0.13
240	20	Tüm ekmek	11.99±0.09	8.16±0.19
		Ekmek içi	13.41±0.18	11.94±0.22
		Ekmek kabuğu	9.88±0.11	8.19±0.20
	25	Tüm ekmek	12.02±0.05	11.03±0.33
		Ekmek içi	13.11±0.06	12.03±0.73
		Ekmek kabuğu	9.37±0.13	8.13±0.54
	30	Tüm ekmek	12.02±0.03	10.72±0.62
		Ekmek içi	12.92±0.08	11.99±0.60
		Ekmek kabuğu	9.88±0.12	8.57±0.76
220 (KONTROL)	25	Tüm ekmek	4.01±0.20	2.88±0.72
		Ekmek içi	4.29±0.06	2.95±0.76
		Ekmek kabuğu	3.71±0.12	2.74±0.74

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

HPLC ve AACC yöntemlerinin sonuçları arasında doğrusal bir korelasyon olduğu saptanmış ve R^2 değeri 0.941 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar t-testi ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Sonuçların arasında yaklaşık % 5'lik fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). İki farklı ölçüm yönteminin karşılaştırıldığı düşünüldüğünde bu farklılığın kabul edilebilir seviyede olduğu söylenebilmektedir. HPLC yöntemi kromatografik yöntem olmakla birlikte analiz sürecinde ileri düzeyde kimyasal reaksiyonlara gereksinim duymamakta, daha az iş gücü gerektirmekte ve bu sayede örnek içerisindeki vitamin miktarı daha doğru şekilde saptanabilmektedir. AACC yöntemi ise çok sayıda kimyasal reaksiyon aşaması içermektedir. Tiaminin potasyum ferrisiyanit ile tiokroma yükselttiği analiz aşamasında pH, çözülmüş oksijen, sıcaklık ve potasyum ferrisiyanit konsantrasyonunun kontrolü önem taşımaktadır. Tiaminin izobütanol ile ekstraksiyonunun dikkatli biçimde yapılmasının potasyum ferrisiyanitin aşırı derecede oksidasyonunun önlenmesi ve uniform tiokrom oksidasyonunun sağlanabilmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Abdel-Kader, 1992). Bu çalışmada ekmek örneklerinin analizi sırasında gözlenen aşırı gazdan dolayı da AACC yöntemlerindeki ölçümlerde kromatografik ölçümden daha farklı sonuç alınmış olabileceği düşünülmektedir.

Farklı proses koşullarının ekmek örneklerinin tiamin içeriği üzerine etkisinin incelenmesinin ardından ekmeğin zenginleştirilmesinde kullanılan diğer bir vitamin olan riboflavin ile ilgili çalışmalar ele alınmıştır. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmeklerin riboflavin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Çalışılan her üç pişme süresi değerinde de üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda fırın sıcaklığındaki artış ile riboflavin miktarlarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bununla birlikte, ekmek içi değerleri incelendiğinde 30 dk pişme süresinde farklı fırın sıcaklıklarının ekmeklerin riboflavin miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.15. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının riboflavin miktarı üzerine etkisi.

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
20	200	10.60±0.28a	11.24±0.16a	10.17±0.20a
	220	8.13±0.16b	8.77±0.12b	7.54±0.19b
	240	7.09±0.17c	8.03±0.27c	6.54±0.21c
25	200	9.52±0.13a	10.60±0.13a	9.40±0.07a
	220	8.09±0.13b	8.33±0.10b	6.61±0.37b
	240	7.00±0.14c	6.94±0.07c	4.99±0.26c
30	200	7.89±0.11a	7.91±0.26a	6.44±0.10b
	220	7.46±0.26b	7.78±0.43a	5.94±0.94ab
	240	6.98±0.10c	7.45±0.29a	5.06±0.15b

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çizelge 4.16. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin riboflavin miktarı üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
200	20	10.60±0.28a	11.24±0.16a	10.17±0.20a
	25	9.52±0.13b	10.60±0.13b	9.40±0.07b
	30	7.89±0.11c	7.91±0.26c	6.44±0.10c
220	20	8.13±0.16a	8.77±0.12a	7.54±0.19a
	25	8.09±0.13a	8.33±0.10b	6.61±0.37ab
	30	7.46±0.26b	7.78±0.43c	5.94±0.94b
240	20	7.09±0.17a	8.03±0.27a	6.54±0.21a
	25	7.00±0.14a	6.94±0.07c	4.99±0.26b
	30	6.98±0.10a	7.45±0.29b	5.06±0.15b

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çizelge 4.16 incelendiğinde ise genel olarak çalışılan her üç sıcaklık değerinde farklı pişme sürelerinde belirlenen riboflavin miktarları arasında istatistiksel olarak önemli fark belirlenmiştir. 200 °C'de pişme süresinin artması ile tüm ekmeğe, ekmeğin içi ve kabuğu bölümlerinin her üçünde de istatistiksel olarak önemli azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). Bununla birlikte, 240 °C'de tüm ekmeğin örneklerindeki riboflavin miktarı pişme süresinin artması ile azalmakla beraber bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Riboflavinin ışığa karşı oldukça hassas bir vitamin olmasının yanısıra ısı ve oksidasyona karşı stabil olduğu belirtilmiştir (Gregory, 1996; Eitenmiller and Landen, 1999). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde hem pişme süresi hem de fırın sıcaklığının riboflavin kaybına neden olduğu fikrini vermektedir. Çalışma kapsamında incelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200 °C, 20 dk) ve maksimum (240 °C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeğin riboflavin değerleri arasında % 34.2'lik azalma olduğu saptanmıştır.

Bunun yanısıra son fermentasyondan sonra hamurdaki riboflavin miktarı ile karşılaştırıldığında pişme sonrasında sıcaklık ve pişme süresine bağlı olarak % 2.5-45.8 arasında artış meydana geldiği de görülmektedir. Batifoulier et al (2005) ise vitaminsiz un ile yaptıkları çalışmalarında fermentasyon sonrası hamur ile ekmekteki riboflavin miktarları arasında % 25 civarında artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Vitamin kayıpları en fazla ekmeğin kabuğunda, ikinci olarak tüm ekmekte ve en az oranda ekmeğin içinde meydana gelmiştir.

Un ile vitamin katkısı kullanılmadan üretilen kontrol ekmeği (tüm ekmeğin) karşılaştırıldığında riboflavin miktarının % 65.1 oranında arttığı görülmektedir. Van Veen and Steinkraus (1970) tarafından geleneksel olarak fermente edilen ekmeklerde riboflavin miktarının genel olarak arttığı gösterilmiştir. Batifoulier et al. (2005) farklı ekmeğin yapım metodlarının bazı vitaminler üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında undan maya fermentasyonu ile ekmeğin yapımı sonucunda riboflavin miktarında % 350'ye varan oranlarda artış olduğunu belirlemişlerdir. Benzer bir sonuç Batifoulier et al. (2006)'da da gösterilmiştir. Bu durumun sadece riboflavinin iyi stabilizeye sahip olmasından değil, aynı zamanda maya fermentasyonu sırasında riboflavin sentezinin

meydana gelmesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Oltmanns and Bacher (1972) tarafından riboflavin döngüsündeki birinci ve ikinci enzimi kodlayan *Saccharomyces cerevisiae* genlerinin (rib1 ve rib 7) fermentasyon sırasında aktive oldukları belirtilmiştir (Batifoulie et al., 2005). Bunun yanısıra Tabekhia and D'Appolonia (1979) ve Ranhotra and Gelroth (1986) hamurdaki riboflavin değerinin hesaplanan değere göre düşük olduğunu, fakat pişme işlemi sonunda bu değerde artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada vitamin katkılı undan elde edilen hamur ve ekmek örnekleri için de benzer bir durum görülmüştür (Çizelge 4.17).

Buğday unlarındaki riboflavin miktarının 0.4-1.5 µg/g aralığında olduğu Lásztity (1999) tarafından belirtilmiştir. Bu çalışmada belirlenen riboflavin miktarı da belirtilen değerler ile uyumludur.

Çizelge 4.17. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen riboflavin miktarı.

Örnek	Riboflavin (µg/g) ^{1,2}
Vitamin katkısız un	0.45±0.01
Vitamin katkılı hamur (2. fermentasyon) ³	6.88±0.10
Vitamin katkılı hamur (son fermentasyon) ³	7.27±0.17

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

³Un örneğine 7.75 µg/g riboflavin katılarak hazırlanmıştır.

Ekmek örneklerindeki riboflavin miktarı HPLC ile belirlendikten sonra standart AACC Metodu No. 86-70 (AACC, 2000)'ye göre florometrik yöntemle de belirlenmiş ve sonuçlar t-testi ile karşılaştırılmıştır. HPLC ve AACC metotları ile ekmeklerde saptanan riboflavin miktarları ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.18 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.

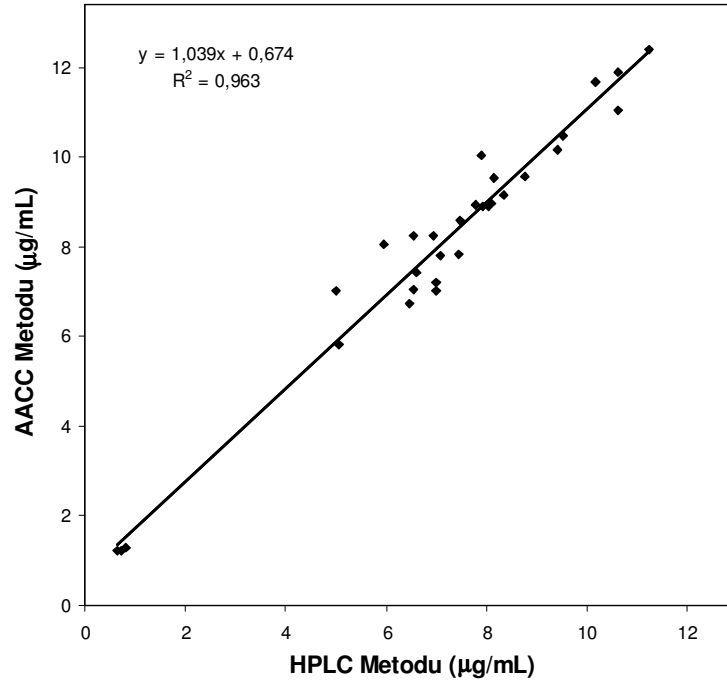
Çizelge 4.18. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-70) ile belirlenen riboflavin miktarları.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Örnek	HPLC Metodu (µg/g) ^{1,2}	AACC Metodu (µg/g) ^{1,2}
200	20	Tüm ekmek	10.60±0.28	11.88±0.62
		Ekmek içi	11.24±0.16	12.41±0.29
		Ekmek kabuğu	10.17±0.20	11.66±0.47
	25	Tüm ekmek	9.52±0.13	10.48±1.05
		Ekmek içi	10.60±0.13	11.04±0.68
		Ekmek kabuğu	9.40±0.07	10.15±0.81
	30	Tüm ekmek	7.89±0.11	10.03±0.73
		Ekmek içi	7.91±0.26	8.89±0.59
		Ekmek kabuğu	6.44±0.10	6.74±0.89
220	20	Tüm ekmek	8.13±0.16	9.55±1.13
		Ekmek içi	8.77±0.12	9.56±0.43
		Ekmek kabuğu	7.54±0.19	8.24±0.17
	25	Tüm ekmek	8.09±0.13	8.96±0.63
		Ekmek içi	8.33±0.10	9.14±0.81
		Ekmek kabuğu	6.61±0.37	7.43±0.40
	30	Tüm ekmek	7.46±0.26	8.57±1.11
		Ekmek içi	7.78±0.43	8.95±0.67
		Ekmek kabuğu	5.94±0.94	8.04±0.73
240	20	Tüm ekmek	7.09±0.17	7.80±0.45
		Ekmek içi	8.03±0.27	8.89±0.36
		Ekmek kabuğu	6.54±0.21	7.05±0.74
	25	Tüm ekmek	7.00±0.14	7.20±0.47
		Ekmek içi	6.94±0.07	8.25±0.62
		Ekmek kabuğu	4.99±0.26	7.02±0.69
	30	Tüm ekmek	6.98±0.10	7.00±0.71
		Ekmek içi	7.45±0.29	7.84±0.50
		Ekmek kabuğu	5.06±0.15	5.82±0.68
220 (KONTROL)	25	Tüm ekmek	0.74±0.18	1.22±0.55
		Ekmek içi	0.80±0.05	1.28±0.30
		Ekmek kabuğu	0.66±0.11	1.22±0.62

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).



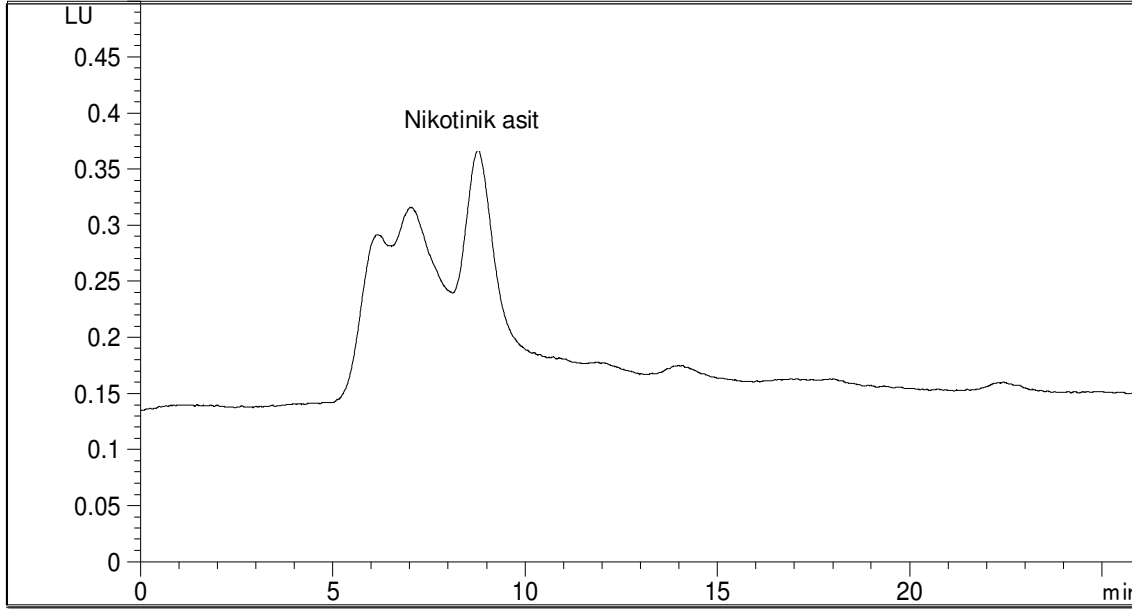
Şekil 4.15. B₂ vitamini analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması.

HPLC ve AACC metotları kullanılarak ölçülmüş kontrol ve zenginleştirilmiş ekmeğin örneklerindeki riboflavin miktarları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar arasında doğrusal korelasyon saptanmış olup R^2 değeri 0.963 olarak saptanmıştır. HPLC metodu sonuçları AACC metodu sonuçlarından yaklaşık % 4.1 oranında düşük elde edilmiş olmasına karşın t-testi sonucunda bu farklılığın önemli olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır.

4.3.2. Ekmek örneklerinde niasin analizleri

Ekmek örneklerinde niasin miktarının belirlenebilmesi için ilk olarak Lahély et al. (1999)'un metodu ile çalışmalara başlanmıştır. Bu metotta niasine kolon sonrası derivatizasyon ile floresans özellik kazandırılarak gıdalardaki miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Lahély et al. (1999), gıdalardaki niasin miktarının belirlenmesi için asit ve alkali hidrolizi ile niasinin farklı formları olan nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP) ve nikotinamidin nikotinik aside dönüştürüldüğünü belirtmektedir. Daha sonra ters faz kromatografisi, kolon sonrası derivatizasyon ve floresans dedektör ile nikotinik asit miktarı belirlenmektedir. Zenginleştirilmiş ekmeğin örneğinden elde edilen ekstraktın kromatogramı Şekil 4.16'da

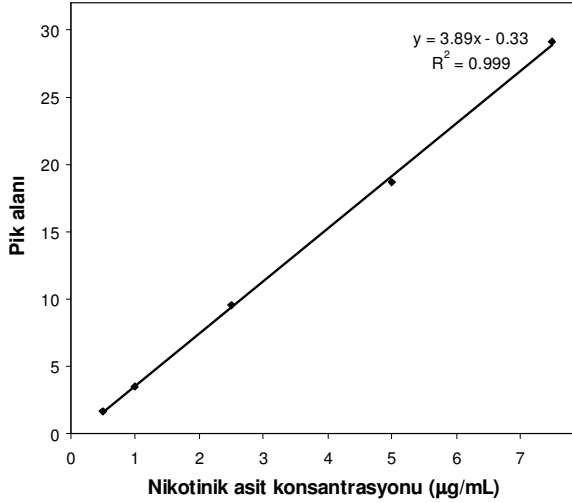
görülmektedir. Lahély et al. (1999)'a göre uygulanan ekstraksiyon metodu ile elde edilen ekstraktlarda nikotinic asit pikinin ayırımı sağlanamamıştır. Bu nedenle farklı bir ekstraksiyon yöntemi öneren Rose-Sallin et al. (2001)'in metodu ile çalışmalara devam edilmiştir.



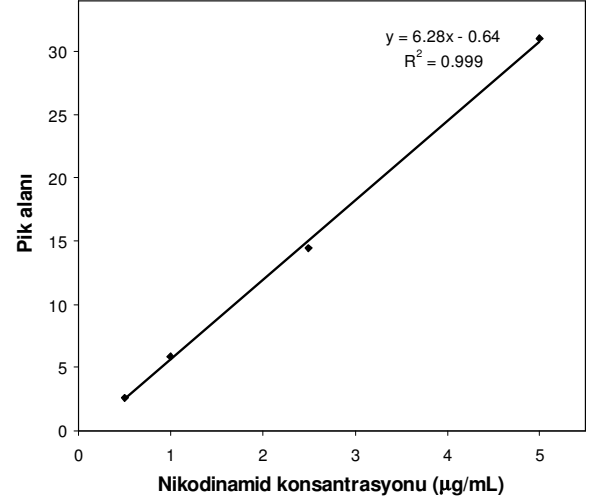
Şekil 4.16. Lahély et al. (1999)'a göre elde edilen zenginleştirilmiş ekmekteki nikotinic asit kromatogramı.

Rose-Sallin et al. (2001) metodunda niasinin zenginleştirilmiş gıdalardan ekstraksiyonu için asit, alkali ve enzimatik hidroliz gibi farklı yöntemler denenmiş, sonuç olarak asit hidrolizi ile asit-alkali hidrolizine göre daha iyi geri kazanım oranı sağlandığı belirtilmiştir. Lahély et al. (1999)'un ekstraksiyon prosedüründe uygulanan alkali hidrolizi ile NAD, NADP ve nikotinamidin nikotinic aside dönüştürülmesi sonucunda sadece bir pik ölçümü yapılması analizi kolaylaştırmaktadır. Ball (1994) ve Windahl et al. (1998), toplam niasin miktarının belirlenmesi için asit hidrolizi ile biyoyarayışlı formlarının, alkali hidrolizi ile ise biyoyarayışlı olmayan formlarının serbest hale getirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Fakat gıda örneklerindeki niasin miktarlarının daha az bulunması, düşük geri kazanım elde edilmesi ve alkali hidrolizi ile asit hidrolizinden daha fazla niasin belirlenememesi nedeniyle asit hidrolizinin tercih edildiği Rose-Sallin et al. (2001) tarafından belirtilmiştir. Rose-Sallin et al. (2001) metodu ile çalışmalara devam edilmiştir. İlk olarak nikotinic asit ve

nikotinamidin kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve 1.000 ve 0.999 korelasyon ile elde edilmiştir (Şekil 4.17-4.18). Zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen ekstrakttaki nikotinic asit ve nikotinamid kromatogramları ise Şekil 4.19'da verilmiştir. Geri kazanım oranı % 95 olarak belirlenmiştir. Sertifikalı referans materyali (süt tozu) içerisindeki niasin miktarı (68 mg/kg) \pm % 3 kabul sınırları içerisinde 66.4 mg/kg olarak saptanmıştır.



Şekil 4.17. Nikotinic asitin kalibrasyon grafiği

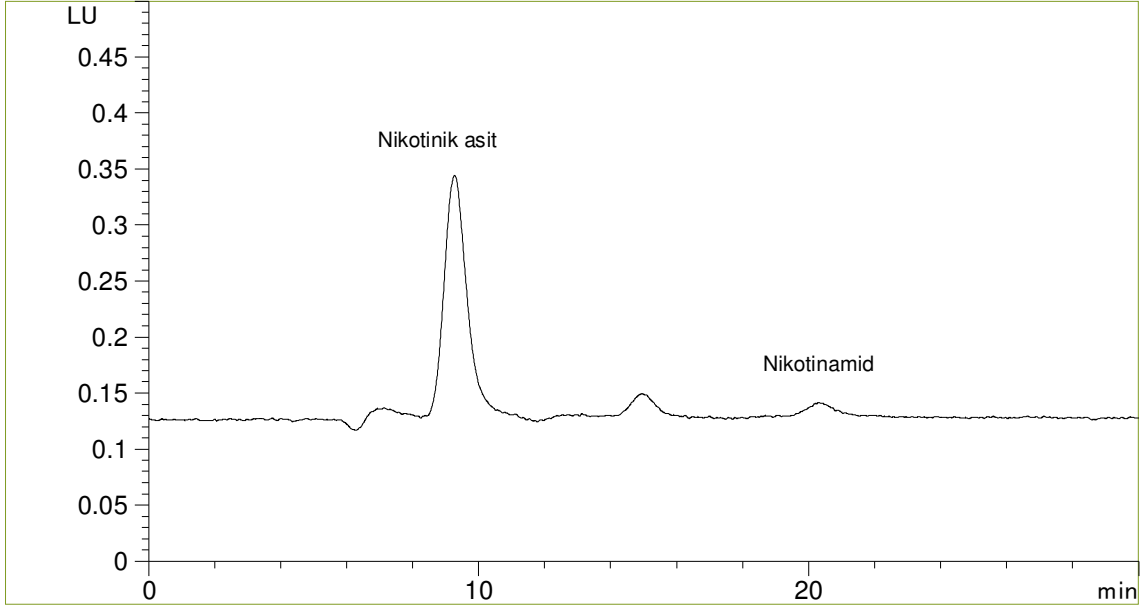


Şekil 4.18. Nikotinamidin kalibrasyon grafiği

Çalışma kapsamında niasin miktarlarının belirlenmesi amacıyla denenen ekstraksiyon koşulları arasında ekmek örneklerinden niasinin ekstraksiyonunda Rose-Sallin et al. (2001)'un metodu ile beklenen sonuçların elde edildiği görülmüştür. Kromatografik olarak en iyi koşulların ise yine Rose-Sallin et al. (2001)'un metodunun modifiye edilmesi ile elde edildiği saptanmıştır. Bu nedenle çalışma kapsamında incelenen ekmeklerin analizlerinde bu metotlar kullanılmıştır.

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmeklerin niasin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.19'da görülmektedir. Çalışılan her üç pişme süresi değerinde de üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda niasin değerleri arasında genel olarak fırın sıcaklığındaki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli oranda azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bununla birlikte, ekmek içi değerleri incelendiğinde 30 dk pişme süresinde farklı fırın sıcaklıklarının ekmeklerin niasin miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir. Tüm ekmek örneği

incelendiğinde her üç pişme süresinde 220°C ve 240°C’de elde edilen niasin miktarları 200°C’de elde edilen değerlere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Benzer durum 30 dk pişme süresinde ekmek içi örneğinde ve 20 dk pişme süresinde ekmek kabuğu örneklerinde de görülmüştür. Ekmek kabuğu örneklerinde 30 dk pişme süresinde belirlenen niasin miktarlarında her üç fırın sıcaklığı için istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmemiştir.



Şekil 4.19. Zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen nikotik asit ve nikotinamid kromatogramı.

Farklı fırın sıcaklarında pişme süresinin ekmek örneklerindeki niasin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.20’de verilmiştir. Genel olarak pişme süresinin ekmek örneklerinin niasin miktarları üzerinde fazla etkisinin olmadığı görülmektedir. Tüm ekmek ve ekmek kabuğu ile ilgili sonuçlar incelendiğinde 220°C ve 240°C fırın sıcaklığında pişirilen örneklerde pişme süresinin artmasının niasin miktarı üzerinde önemli etkisinin olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır. Bununla beraber 200°C ve 240°C’de pişme süresi ile ekmek içi örneklerinde istatistiksel olarak önemli fark saptanmazken, 200°C’de tüm ekmekte 20 ve 30 dk pişme sürelerinde belirlenen niasin miktarları arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır. Benzer şekilde 200°C’de ekmek kabuğunda 30 dk pişme süresindeki niasin miktarının 20 ve 25 dk pişme süresindeki göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.19. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının niasin miktarı üzerine etkisi.

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
20	200	102.82±1.36a	103.79±0.85a	99.40±0.81a
	220	86.71±2.94b	100.98±2.39a	84.54±0.57b
	240	87.83±2.69b	93.57±1.88b	84.28±0.79b
25	200	100.75±0.80a	103.15±1.53a	97.47±1.16a
	220	86.46±0.44b	96.69±0.56b	81.88±0.59c
	240	88.03±3.39b	93.74±0.99c	84.77±1.73b
30	200	96.68±3.41a	101.83±1.07a	86.99±2.25a
	220	84.89±1.04b	94.00±0.44b	82.91±4.73a
	240	86.23±1.59b	92.46±1.09b	86.51±2.73a

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çizelge 4.20. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin niasin miktarı üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
200	20	102.82±1.36a	103.79±0.85a	99.40±0.81a
	25	100.75±0.80ab	103.15±1.53a	97.47±1.16a
	30	96.68±3.41b	101.83±1.07a	86.99±2.25b
220	20	86.71±2.94a	100.98±2.39a	84.54±0.57a
	25	86.46±0.44a	96.69±0.56b	81.88±0.59a
	30	84.89±1.04a	94.00±0.44b	82.91±4.73a
240	20	87.83±2.69a	93.57±1.88a	84.28±0.79a
	25	88.03±3.39a	93.74±0.99a	84.77±1.73a
	30	86.23±1.59a	92.46±1.09a	86.51±2.73a

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çalışma kapsamında incelenen pişme süresi ve fırın sıcaklığının minimum (200°C, 20 dk) ve maksimum (240°C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin niasin değerleri arasında % 16.1'lik azalma olduğu saptanmıştır. Diğer vitamin sonuçlarında olduğu gibi ekmek kabuğunda, tüm ekmek ve ekmek içi vitamin değerlerine göre daha düşük niasin miktarı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar niasinin pişme koşullarına karşı stabil olduğunu göstermektedir. Maleki and Dagher (1966), normal ekmek pişirme koşullarında başlangıçtaki niasin miktarının % 95-100 oranında korunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise farklı fırın sıcaklığı ve pişme süresi koşullarında % 3.3-18.1 arasında kayıp meydana geldiği görülmüştür.

Vitamin katkılı un ile son fermentasyondan sonra hamur örneğindeki niasin miktarları incelendiğinde fermentasyon ile % 3.7 oranında artış meydana geldiği görülmüştür. Bu çalışmaya benzer şekilde hamurdaki niasin miktarının una göre biraz yüksek olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (Tabekhia and D'appolonia, 1979; Özkaya and Özkaya; 1999).

Çizelge 4.21. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen niasin miktarı.

Örnek	Niasin ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2}
Vitamin katkısız un	5.51±0.16
Vitamin katkılı hamur (2. fermentasyon) ³	105.85±0.83
Vitamin katkılı hamur (son fermentasyon) ³	103.68±1.56

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

³Un örneğine 94.5 $\mu\text{g/g}$ niasin katılarak hazırlanmıştır.

Buğday unlarındaki niasin miktarının 12-55 $\mu\text{g/g}$ aralığında olduğu belirtilmiştir (Lásztity, 1999). Ndaw et al. (2002) farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak buğday ununda 3.5-7.5 $\mu\text{g/g}$ aralığında niasin belirlemişlerdir. Bu yöntemler arasında Rose-Sallin et al. (2001)'e benzer bir şekilde 0.1 M HCl ile 1 saat 100°C'deki su banyosunda inkübasyonun olduğu yöntem kullanılarak belirlenen niasin miktarı ise 7.5 $\mu\text{g/g}$ 'dir. Bu çalışmada elde edilen değer, belirtilen değerlere göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.22. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmeklerde HPLC ve AACC Metodu (86-50A) ile belirlenen niasin miktarları.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Örnek	HPLC Metodu (µg/g) ^{1,2}	AACC Metodu (µg/g) ^{1,2}
200	20	Tüm ekmek	102.82±1.36	96.85±3.40
		Ekmek içi	103.79±0.85	101.73±2.94
		Ekmek kabuğu	99.40±0.81	90.58±1.88
	25	Tüm ekmek	100.75±0.80	88.53±4.92
		Ekmek içi	103.15±1.53	99.05±1.81
		Ekmek kabuğu	97.47±1.16	94.07±4.99
	30	Tüm ekmek	96.68±3.41	86.01±2.25
		Ekmek içi	101.83±1.07	97.23±2.91
		Ekmek kabuğu	86.99±2.25	85.43±1.33
220	20	Tüm ekmek	86.71±2.94	82.02±2.18
		Ekmek içi	100.98±2.39	82.20±2.21
		Ekmek kabuğu	84.54±0.57	76.17±4.09
	25	Tüm ekmek	86.46±0.44	93.46±5.21
		Ekmek içi	96.69±0.56	92.55±1.31
		Ekmek kabuğu	81.88±0.59	78.73±5.61
	30	Tüm ekmek	84.89±1.04	71.61±2.91
		Ekmek içi	94.00±0.44	87.49±3.44
		Ekmek kabuğu	82.91±4.73	70.40±1.95
240	20	Tüm ekmek	87.83±2.69	73.91±2.24
		Ekmek içi	93.57±1.88	74.63±2.10
		Ekmek kabuğu	84.28±0.79	67.49±4.05
	25	Tüm ekmek	88.03±3.39	62.69±3.83
		Ekmek içi	93.74±0.99	69.33±4.82
		Ekmek kabuğu	84.77±1.73	67.70±2.72
	30	Tüm ekmek	86.23±1.59	68.32±2.92
		Ekmek içi	92.46±1.09	82.04±3.71
		Ekmek kabuğu	86.51±2.73	65.85±4.67
220 (KONTROL)	25	Tüm ekmek	13.02±0.39	11.30±0.80
		Ekmek içi	15.09±0.95	22.70±1.51
		Ekmek kabuğu	12.32±0.32	7.23±2.11

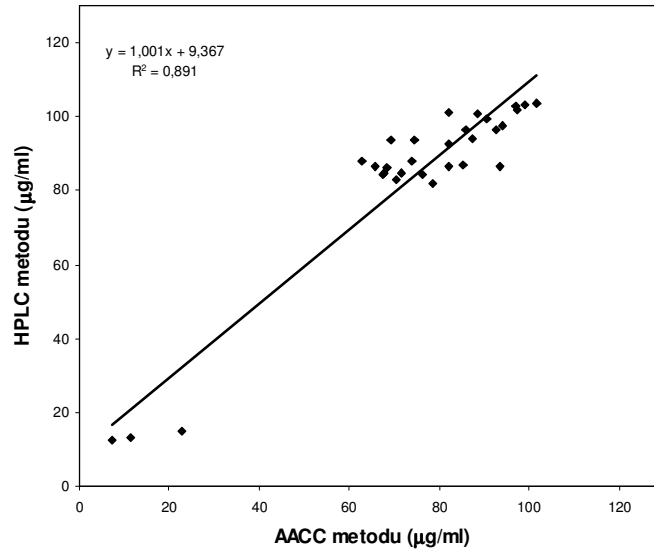
¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Ekmek örneklerindeki niasin miktarı HPLC ile belirlendikten sonra standart AACC Metodu No. (86-50A) (AACC, 2000)'ye göre kolorimetrik olarak da belirlenmiş ve sonuçlar t-testi ile karşılaştırılmıştır. HPLC ve AACC metotları ile ekmeklerde saptanan niasin miktarları ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.22 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Kontrol ve zenginleştirilmiş ekmek örnekleri için HPLC yöntemi ile elde edilen niasin sonuçları AACC metoduyla elde edilen sonuçlara karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.20). Sonuçlar arasında doğrusal korelasyon saptanmış olmasına karşın R^2 değeri 0.891 olarak elde edilmiştir. Bu durum yöntem sonuçları arasında belirgin bir farklılık olduğunu ifade etmektedir. Ekmek örneklerinin niasin içeriklerinin AACC Metodu No. 86-50A (AACC, 2000)'ye göre belirlenmesinde hidroliz, klarifikasyon ve renk gelişimi aşamaları gerçekleştirilmekte olup bu aşamalar oldukça zahmetli ve tehlikeli basamakları içermektedir. Renk gelişimi aşamasında siyanojen bromür kullanılmaktadır. Bu maddenin çok zehirli olmasının yanısıra kontrolü zor bir aşamadır. Renk oluşumu kararsız davranabilmekte ve reaksiyon sürecinin farklı aşamalarında farklı sonuçlar alınabilmekte ve bu durum analiz sonucunu etkileyebilmektedir. Dolayısıyla AACC yöntemi hata yapmaya açık bir yöntemdir. Bu



Şekil 4.20. Niasin analizinde HPLC metodu ile elde edilen sonuçların AACC metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

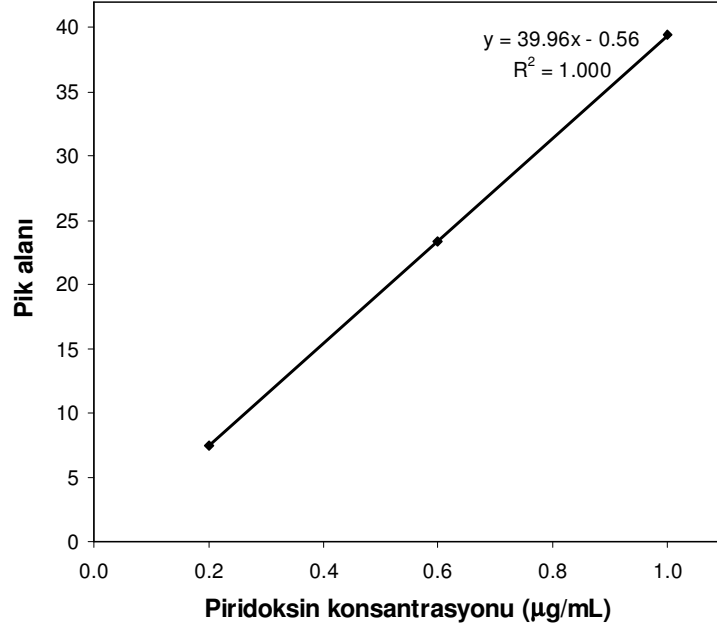
tür hata kaynaklarını bünyesinde barındırmayan HPLC yönteminin niasin tayininde kullanılması ile daha doğru sonuçlar daha kolay bir şekilde elde edilebilmektedir.

4.3.3. Ekmek örneklerinde piridoksin analizleri

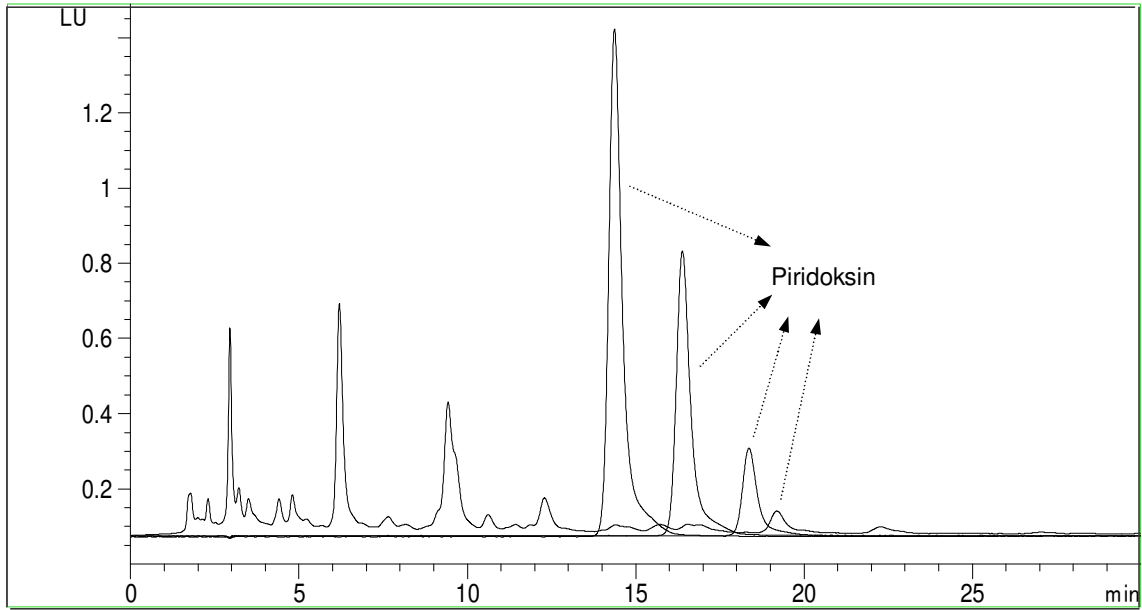
Gıdalarda B₆ vitamininin belirlenebilmesi için floresans dedektörlü HPLC sistemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. B₆ vitamini gıdalarda piridoksin (piridoksol), piridoksal, piridoksamin, bunların fosfat esterleri ve piridoksin glukozid formlarında bulunmaktadır. Gıdalardaki B₆ vitamini miktarının belirlenmesi amacıyla bu vitamerleri HPLC ile tek tek belirleyen çalışmalar bulunmaktadır (Bognar and Ollilainen, 1997; Argoudelis, 1997; Kall, 2003; Vinas et al., 2004). Fakat kompleks matrikse sahip olan gıdalardaki B₆ vitamerlerinin belirlenmesinde yaşanan zorluklar nedeniyle bu metotların kullanımları kısıtlanmaktadır. Reitzer-Bergaentzlé et al. (1993) tarafından eşit vitamin aktivitesine sahip olan B₆ vitamerlerinin piridoksine dönüşümünü gerçekleştirilerek B₆ vitamini miktarını belirleyen bir kromatografik metot geliştirilmiştir. Bu metot daha sonra modifiye edilerek çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Bergaentzlé et al., 1995; Ndaw et al., 2000; Batifoulier et al., 2005; 2006).

Çalışma kapsamında incelenen ekmek örneklerinin B₆ vitamini analizi için ilk olarak Bergaentzle et al. (1995)'un metodu üzerinde çalışılmıştır. Ayırım ters faz ion çifti kromatografisi ile Lichrospher RP 18-5 Endcapped C18 (4.0 mm x 250 mm, 5 µm) ters faz HPLC kolonunda yapılmıştır. Sistemde floresans dedektör kullanılarak 290 nm eksitasyon ve 395 nm emisyon dalga boylarında analiz gerçekleştirilmiştir. B₆ vitamini standardının kalibrasyon grafiği 1.000 korelasyon ile elde edilmiştir (Şekil 4.21).

Ekmek örneğinden B₆ vitamininin ekstraksiyonu Bergaentzle et al. (1995) metoduna göre yapıldıktan sonra HPLC'de analiz edilmiştir. Pik simetrileri iyi olmamakla beraber piridoksin pikinin alıkonma süresinde sürekli olarak kayma olduğu görülmüştür (Şekil 4.22). Bu durumun mobil faz kompozisyonunun sıcaklığın etkisiyle değişmesi, metotta önerilenden farklı bir HPLC kolonunun kullanılması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sistemde stabilitenin sağlanamaması nedeniyle başka kromatografik koşullarda denemelere devam edilmiştir.



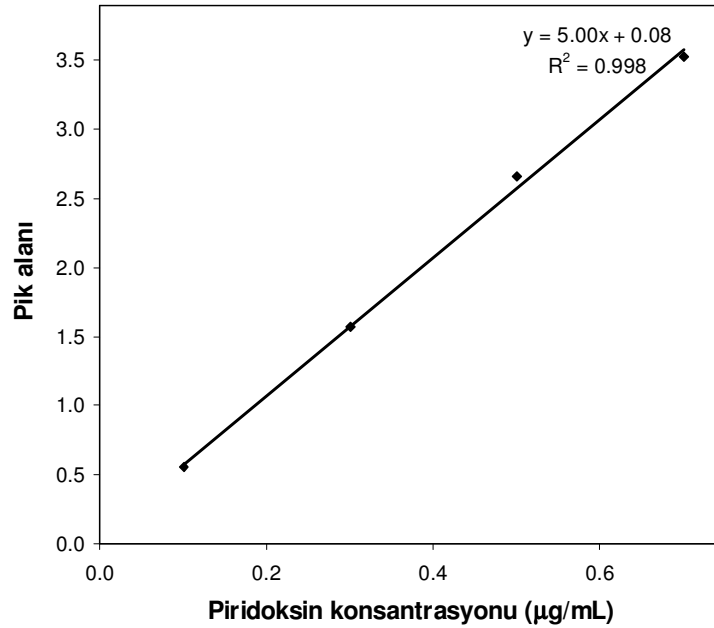
Şekil 4.21. B₆ vitamini standardının kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.22. Bergaenztle et al. (1995) metoduna göre elde edilen ekmek ekstraktının ve piridoksin standartlarının kromatogramı (soldan sağa doğru sırasıyla 1 ppm, 0.6 ppm, 0.2 ppm piridoksin hidroklorid ve normal ekmek ekstraktındaki piridoksin kromatogramı)

Farklı ekmek yapma metotlarının buğday ekmeğinin tiamin, riboflavin ve piridoksin içeriği üzerine etkisinin incelendiği Batifoulier et al. (2005) ve buğday tanesi, öğütme fraksiyonları ve ekmek ürünlerindeki B vitaminlerinin içeriklerinin çeşitliliğinin araştırıldığı Batifoulier et al. (2006) metotlarındaki koşullar gözönüne alınarak çalışmalara devam edilmiştir. İlk olarak Batifoulier et al. (2005 ve 2006)'un kromatografik koşulları üzerinde çalışılmıştır. Mobil faz olarak 0.075 mM sodyum perklorat ve % 0.05 trietilamin içeren 0.07 mM sodyum dihidrojen fosfat tamponu, pH 3.38 – asetonitril (90:10, v/v) karışımı izokratik olarak kullanılmıştır. Floresans dedektör ile 325 nm eksitasyon, 400 nm emisyon dalgaboylarında analiz gerçekleştirilmiştir.

B₆ vitamininin kalibrasyon grafiği 0.999 korelasyon ile elde edilmiştir (Şekil 4.23). Bunu takiben ekmek örneklerinden B₆ vitamininin ekstraksiyonu Batifoulier et al. (2005 ve 2006)'a göre uygulanmıştır.

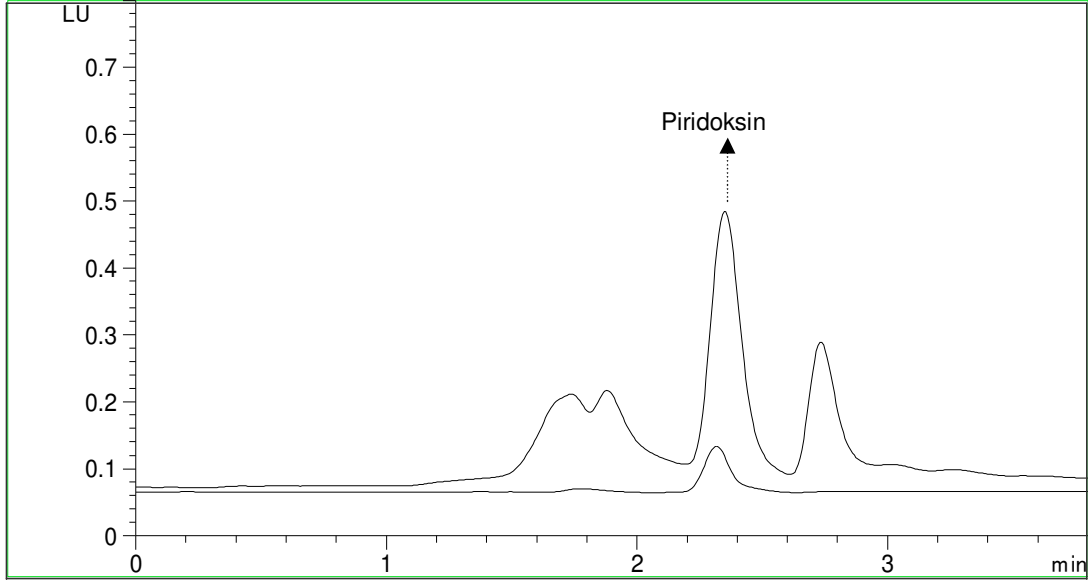


Şekil 4.23. B₆ vitamininin kalibrasyon grafiği

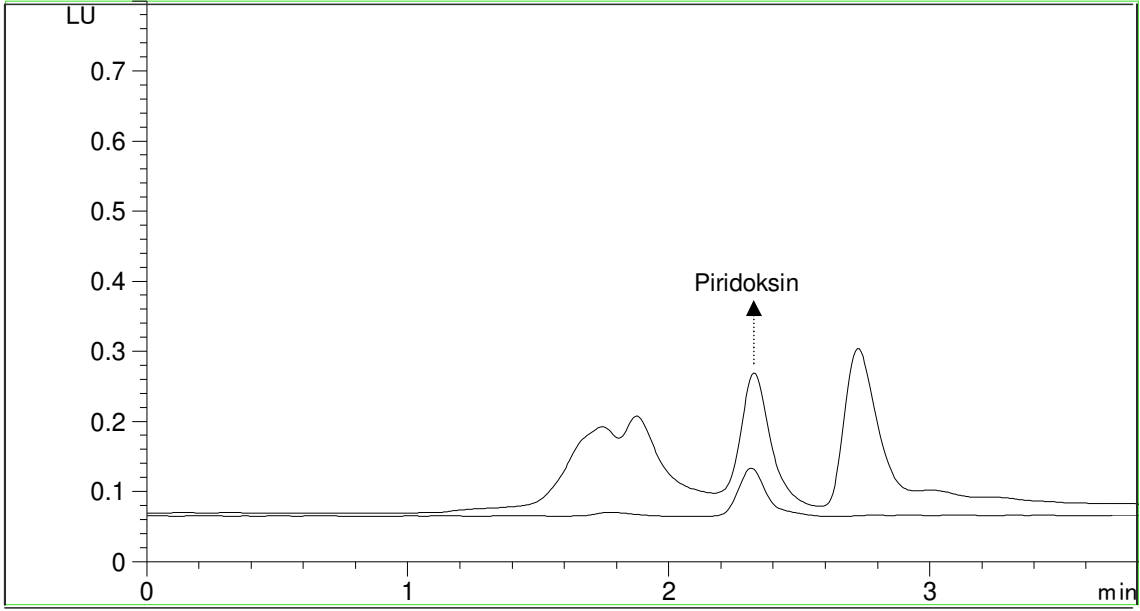
Batifoulier et al. (2005 ve 2006) metotlarında örnek matriksinden ekstraksiyon prosedüründe vitamin B₆'nın asit fosfataz enzimi ile fosfat esterlerinden ayrılması sağlanmaktadır. Piridoksinin Fe²⁺ varlığında glyoxylic asit ile reaksiyona girerek

pidoksala dönüşmekte, pidoksal ise alkali ortamda sodyum borohidrid tarafından piridoksin indirgenmektedir. Bu aşamalardan sonra B₆ vitamini miktarı 'piridoksin' formunda florometrik olarak belirlenmektedir (Reitzer-Bergaentzlé et al., 1993; Blake, 2007).

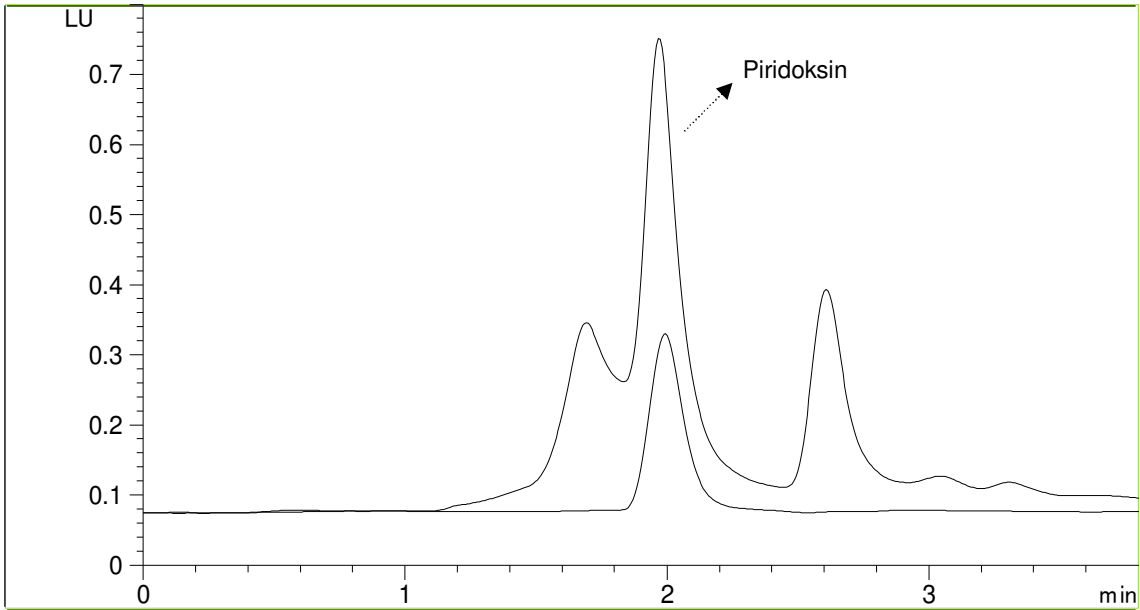
Elde edilen ekmek ekstraktlarındaki piridoksin miktarının belirlenmesi için Batifoulier et al. (2005 ve 2006) yönteminin kromatografik koşulları üzerinde çalışılmıştır. Kolon sonrası derivatizasyonu amacıyla kullanılan tampon çözeltinin (1g/L sodyummetabisülfid içeren 123 mM sodyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 11.0)) ve ekmek ekstraktının HPLC analizi öncesinde sodyum borohidrid ile reaksiyonunun analiz sonuçları üzerinde etkisinin incelenmesi amacıyla bazı denemeler yapılmıştır. İlk olarak metodun tam olarak uygulandığı şekilde sodyum borohidrid ile reaksiyonun ve kolon sonrası derivatizasyonun yapıldığı zengin ekmek örneğinin HPLC ile analizi yapılmıştır (Şekil 4.24). Bunu takiben bu iki koşulun sırasıyla değiştirildiği analizler yapılmıştır (Şekil 4.25-4.27).



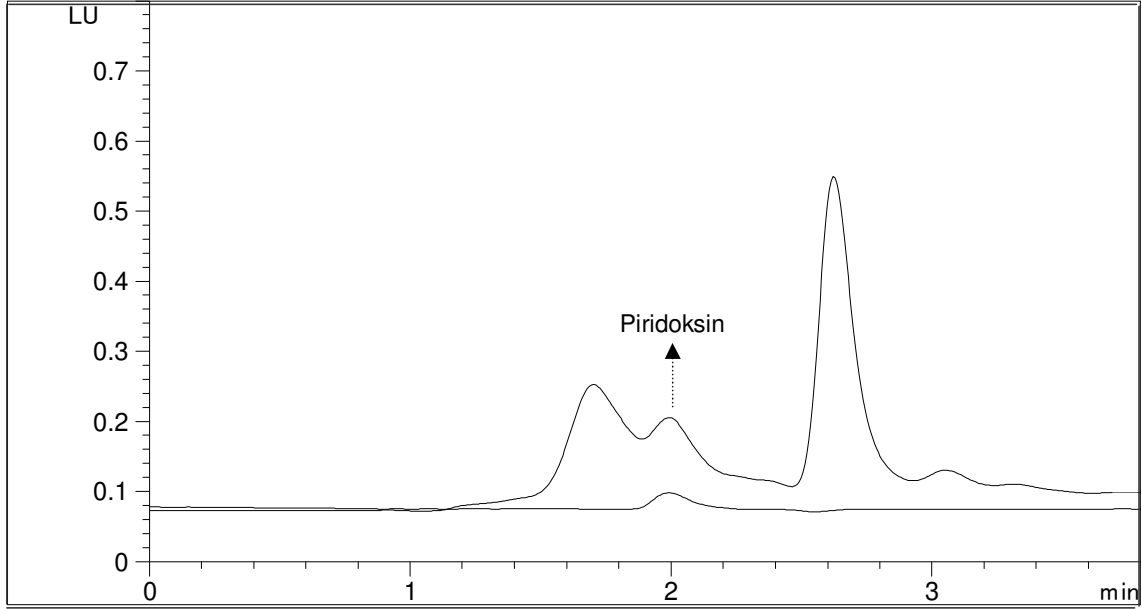
Şekil 4.24. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun ve kolon sonrası derivatizasyonun uygulandığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B₆ standardı kromatogramı.



Şekil 4.25. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleştiği, kolon sonrası derivatizasyonun uygulanmadığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmeğin ve B₆ standardı kromatogramı.



Şekil 4.26. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleşmediği, kolon sonrası derivatizasyonun uygulandığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmeğin ve B₆ standardı kromatogramı.



Şekil 4.27. Sodyum borohidrid ile reaksiyonun ve kolon sonrası derivatizasyonun uygulanmadığı koşullarda elde edilen zenginleştirilmiş ekmek örneği ve B₆ standardı kromatogramı.

Kromatogramlar incelendiğinde sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleştiği koşullarda başarılı pik ayırımının olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kolon sonrası derivatizasyon ile örnekteki B₆ vitamini piki alanında 2.3 kat artış olmuştur (Şekil 4.24 ve 4.25). Sodyum borohidrid ile reaksiyonun gerçekleşmediği her iki durumda (Şekil 4.26 ve 4.27) ise piridoksalın piridoksin'e dönüşümünün gerçekleşmemesinden dolayı iyi bir ayırımın elde edilemediği düşünülmektedir. Kolon sonrası derivatizasyon ile pik alanında 4.8 kat artış meydana gelmiştir.

Batifoulie et al. (2005 ve 2006) metotlarına göre örneklerde piridoksin miktarının belirlenmesi ile ilgili analizler tamamlanmıştır. Geri kazanım oranı % 89 olarak saptanmıştır. Sertifikalı referans materyali (tam buğday unu) içerisindeki piridoksin miktarı (4.1 mg/kg) \pm % 25 kabul sınırları içerisinde 3.40 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Buğday unlarındaki piridoksin miktarının 1.7-5.5 μ g/g aralığında olduğu belirtilmiştir (Lásztity, 1999). Batifoulie et al. (2005) inceledikleri on çeşit buğday unundaki piridoksin miktarının 0.28-0.52 μ g/g arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada buğday unu için elde edilen piridoksin değeri literatürde belirtilen değerlere yakındır. Un ve hamur örneklerinde belirlenen sonuçlar Çizelge 4.23'te verilmiştir.

Çizelge 4.23. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen piridoksin miktarı.

Örnek	Piridoksin ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2}
Vitamin katkısız un	0.56 \pm 0.03
Vitamin katkılı hamur (2. fermentasyon) ³	10.68 \pm 0.31
Vitamin katkılı hamur (son fermentasyon) ³	9.93 \pm 0.49

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

³Un örneğine 9.69 $\mu\text{g/g}$ piridoksin katılarak hazırlanmıştır.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p < 0.05$).

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmeklerin piridoksin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.24'te görülmektedir. Çalışılan her üç pişme süresi değerinde de üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda fırın sıcaklığındaki artış ile piridoksin miktarlarında genel olarak meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm ekmek örneği incelendiğinde, 20 dk ve 30 dk pişme sürelerinde 220 °C ve 240 °C fırın sıcaklıklarında belirlenen piridoksin miktarlarının 200 °C'de belirlenen değere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Ekmek kabuğu örneklerinde ise 20 dk ve 25 dk pişme sürelerinde 240 °C'de elde edilen değerlerin 200 °C ve 220 °C'de elde edilenlere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ekmek içi örnekleri incelendiğinde 20 ve 25 dk pişme sürelerinde her üç fırın sıcaklığında elde edilen değerler arasında bir fark saptanmazken, 30 dk pişme süresinde 240 °C'de elde edilen piridoksin miktarının 200 °C ve 220 °C'de elde edilen değerlere göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Farklı fırın sıcaklarında pişme süresinin ekmek örneklerindeki piridoksin miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.25'te verilmiştir. Tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğu kısımlarında 200 °C fırın sıcaklığında pişme süresindeki artışa bağlı olarak piridoksin miktarlarında istatistiksel olarak önemli bir değişim saptanmamıştır. Aynı durum 220 °C'de her üç pişme süresinde elde edilen ekmek içi değerleri için de geçerlidir. 220 °C fırın sıcaklığında tüm ekmek ve ekmek kabuğunda 30 dk pişme süresinde elde edilen piridoksin miktarlarının 20 ve 25 dk pişme süresinde elde edilen değerlere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. 240 °C'de ise 25 ve 30 dk pişme sürelerinde elde edilen piridoksin miktarlarının 20 dk pişme süresinde elde edilen değerlere göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.24. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının piridoksin miktarı üzerine etkisi

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
20	200	7.66±0.19a	7.94±0.31a	7.21±0.27a
	220	7.01±0.36b	8.37±0.40a	6.82±0.49a
	240	6.85±0.17b	8.09±0.03a	5.29±0.14b
25	200	7.63±0.40a	7.74±0.37a	6.49±0.26a
	220	7.22±0.18a	8.24±0.22a	6.48±0.19a
	240	5.44±0.06b	7.48±0.49a	4.85±0.21b
30	200	7.23±0.44a	7.87±0.26a	6.68±0.95a
	220	5.68±0.06b	8.27±0.16a	5.56±0.09ab
	240	5.15±0.17b	7.33±0.06b	4.53±0.09b

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çizelge 4.25. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin piridoksin miktarı üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
200	20	7.66±0.19 a	7.94±0.31a	7.21±0.27a
	25	7.63±0.40 a	7.74±0.37a	6.49±0.26a
	30	7.23±0.44 a	7.87±0.26a	6.68±0.95a
220	20	7.01±0.36 a	8.37±0.40a	6.82±0.49a
	25	7.22±0.18 a	8.24±0.22a	6.48±0.19a
	30	5.68±0.06 b	8.27±0.16a	5.56±0.09b
240	20	6.85±0.17 a	8.09±0.03a	5.29±0.14a
	25	5.44±0.06 b	7.48±0.49ab	4.85±0.21b
	30	5.15±0.17 b	7.33±0.06b	4.53±0.09b

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çalışma kapsamında incelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200°C, 20 dk) ve maksimum (240°C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin piridoksin değerleri arasında % 32.8'lik azalma olduğu saptanmıştır.

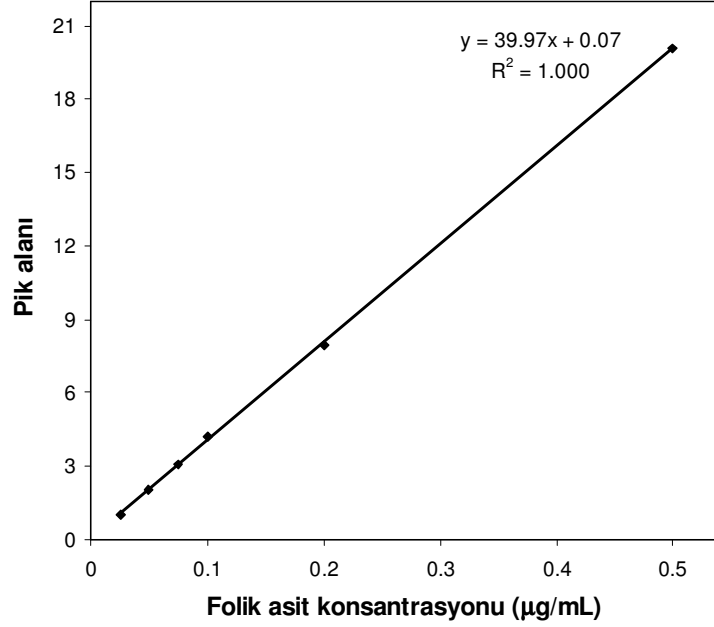
Analiz sonuçları incelendiğinde, farklı pişme süresi ve sıcaklıklarında üretilen ekmek örneklerindeki B₆ vitamini miktarlarında una göre % 18.3-55.8 arasında azalma olduğu görülmüştür. Fırın sıcaklığının 200°C'den 240°C'ye yükselmesi ile genel olarak B₆ vitamini miktarı azalmıştır. Vitamin kaybı en az iç kısımda, en fazla ise kabuk kısmında meydana gelmiştir. Batifoulie et al. (2005) ve Batifoulie et al. (2006) çalışmalarında maya ile fermentasyonun yer aldığı ve 250°C'de 25 dakika pişme işleminin uygulandığı beyaz un ile ekmek yapma proseslerinde % 62 oranında piridoksin kaybı meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu sonuç, bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyumludur.

4.3.4. Ekmek örneklerinde folik asit analizleri

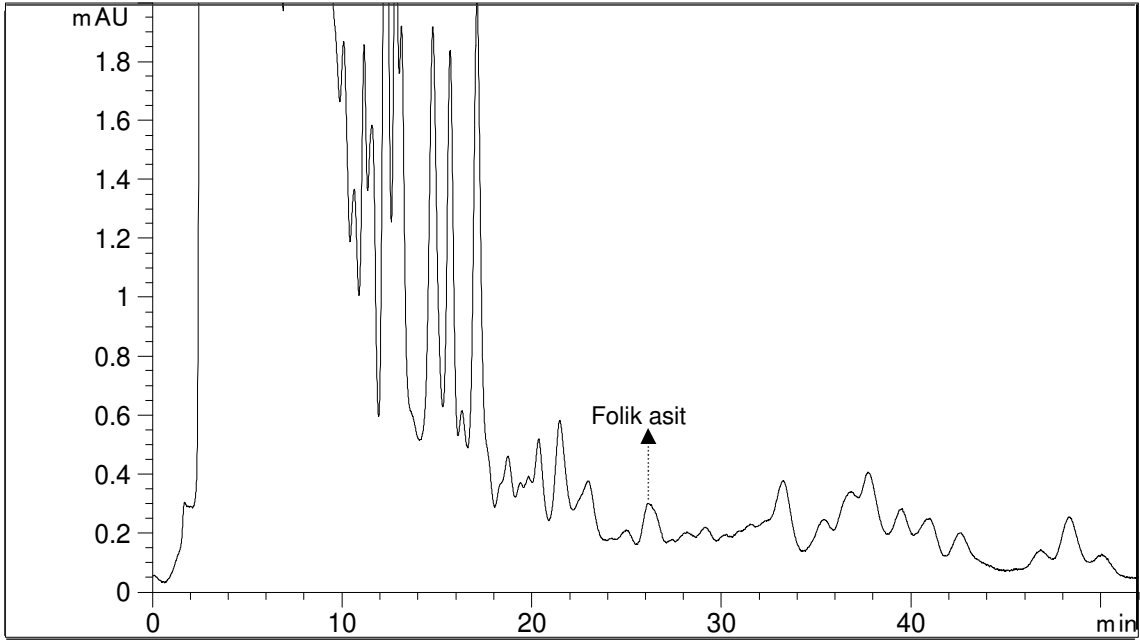
Ekmek örneklerinde HPLC ile folik asit miktarının belirlenebilmesi amacıyla Osseyi et al. (2001)'un metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

İlk olarak folik asidin kalibrasyon grafiği çizilmiş ve 1.000 korelasyon ile elde edilmiştir (Şekil 4.28). Geri kazanım oranı % 98 olarak saptanmıştır. Sertifikalı referans materyali (süt tozu) içerisindeki folik asit miktarı (1.42 mg/kg) ± % 10 kabul sınırları içerisinde 1.29 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Ekmek örneklerinden folik asidin ekstraksiyonu yapılmış ve ters faz kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.29'da zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen folik asit kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.28. Folik asitin kalibrasyon grafiği (0.025-0.500 ppm).



Şekil 4.29. Zenginleştirilmiş ekmek örneğinden elde edilen folik asit kromatogramı.

Çizelge 4.26. Un ve hamur örneklerinde HPLC metodu ile belirlenen folik asit miktarı.

Örnek	Folik Asit ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2}
Vitamin katkısız un	0.38±0.03
Vitamin katkılı hamur (2. fermentasyon) ³	1.62±0.02
Vitamin katkılı hamur (son fermentasyon) ³	1.48±0.24

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

³Un örneğine 0.81 $\mu\text{g/g}$ folik asit katılarak hazırlanmıştır.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p<0.05$).

Buğday ununda bulunan folik asit miktarının 0.27-0.40 $\mu\text{g/g}$ aralığında olduğu belirtilmiştir (Lásztity, 1999). Bu çalışmada elde edilen değer verilen aralıkta yer almaktadır (Çizelge 4.26).

Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının ekmeklerin folik asit miktarları üzerine etkisi Çizelge 4.27'de görülmektedir. Genel olarak her üç pişme süresinde de fırın sıcaklığına bağlı olarak folik asit miktarlarındaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte 20 dk pişme süresinde tüm ekmekte ve 25 dk pişme süresinde ekmek kabuğunda sıcaklığın 200°C'den 240°C'ye artmasıyla elde edilen folik asit miktarlarında istatistiksel olarak önemli derecede azalma saptanmıştır.

Farklı fırın sıcaklarında pişme süresinin ekmek örneklerindeki folik asit miktarları üzerine etkisi Çizelge 4.28'de verilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde her üç fırın sıcaklığında farklı pişme sürelerinde elde edilen folik asit miktarları arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı belirlenmiştir.

Genel olarak incelendiğinde pişme süresinin ve fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin folik asit içerikleri üzerine önemli etkisinin bulunmadığını söylenebilmektedir.

Çizelge 4.27. Farklı pişme sürelerinde fırın sıcaklığının folik asit miktarı üzerine etkisi.

Pişme Süresi (dk)	Fırın Sıcaklığı (°C)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
20	200	1.39±0.10a	1.40±0.08a	1.37±0.03a
	220	1.28±0.03ab	1.33±0.03a	1.20±0.31a
	240	1.25±0.01b	1.30±0.04a	1.15±0.01a
25	200	1.37±0.07a	1.38±0.12a	1.31±0.08a
	220	1.26±0.10a	1.34±0.03a	1.18±0.04ab
	240	1.25±0.09a	1.33±0.08a	1.10±0.08b
30	200	1.30±0.10a	1.29±0.01a	1.21±0.07a
	220	1.29±0.11a	1.25±0.05a	1.18±0.08a
	240	1.25±0.07a	1.23±0.05a	1.11±0.05a

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çizelge 4.28. Farklı fırın sıcaklıklarında pişme süresinin folik asit miktarı üzerine etkisi.

Fırın Sıcaklığı (°C)	Pişme Süresi (dk)	Tüm ekmek ^{1,2}	Ekmek içi ^{1,2}	Ekmek kabuğu ^{1,2}
200	20	1.39±0.10a	1.40±0.08a	1.37±0.03a
	25	1.37±0.07a	1.38±0.12a	1.31±0.08ab
	30	1.23±0.10a	1.29±0.01a	1.21±0.07b
220	20	1.28±0.03a	1.33±0.03a	1.20±0.31a
	25	1.26±0.08a	1.34±0.03a	1.18±0.04a
	30	1.29±0.11a	1.25±0.05b	1.18±0.08a
240	20	1.25±0.01a	1.31±0.04a	1.15±0.01a
	25	1.26±0.09a	1.33±0.08a	1.12±0.08a
	30	1.25±0.07a	1.23±0.05a	1.12±0.05a

¹Kuru madde esasına göre

²Değerler üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmaları ile verilmiştir.

Aynı sütunda aynı harfi kapsayan değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çalışma kapsamında incelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200°C, 20 dk) ve maksimum (240°C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin folik asit değerleri arasında % 10.1'lik azalma olduğu saptanmıştır.

Folik asit analizi sonuçları incelendiğinde, folik asit miktarlarında una göre % 18'e varan miktarlarda artış olduğu, bu artışın fermentasyon aşamasında meydana geldiği görülmektedir. Calhoun et al. (1958), hamurda bulunan diğer ingrediyelemlerden dolayı ekmekteki folik asit miktarının una göre daha fazla olduğuna işaret etmiştir. Keagy et al. (1975) ise ekmek yapım prosesinin çeşitli aşamalarında doğal ve eklenen folat içeriğini belirlemiş ve fermentasyon sırasında toplam folat içeriğinin arttığını belirtmiştir. Bunun nedeninin maya tarafından gerçekleştirilen folat sentezi olabileceği ifade edilmiştir (Osseyi et al., 2001).

Vitamin katkılı ekmeklerde farklı fırın sıcaklığı ve pişme sürelerinde elde edilen folik asit miktarları incelendiğinde ise ekmeğin kabuk kısmında, bütün ve iç kısımlarına göre daha fazla vitamin kaybı meydana geldiği görülmüştür. Folik asit miktarında ekmeğin pişme prosesi sırasında hamura göre farklı proses koşullarında % 5.4-25.0 arasında azalma meydana geldiği saptanmıştır. Benzer sonuçların elde edildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Osseyi et al. (2001) çalışmalarında, AACC Metodu No. 10-11 (AACC, 2000)'ye göre sponge-dough metodu ile 218±5°C'de 25 dk pişme süresinde üretilen ekmeklerdeki folik asit miktarının % 20 civarında azaldığını belirtmişlerdir. Keagy et al. (1975) pişme işlemi ile folik asit miktarında %14 oranında kayıp olduğunu rapor etmişlerdir. Gujska and Majewska (2005) ise 230°C'de 30 dk pişme süresinde üretilen ekmeklerde pişme işlemi ile folik asit miktarının % 18.6 oranında azaldığını saptamışlardır. Elde edilen sonuçların pişme prosesi gibi yoğun ısı işlem koşullarında folik asitin iyi stabiliteye sahip olduğunu gösterdiği ifade edilmiştir (Osseyi et al., 2001). Bu çalışmada elde edilen sonuçların literatürde yer alan sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, un örneği tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin ve folik asit içeren vitamin katkısı ile RDA düzeyleri dikkate alınarak zenginleştirilmiştir. Farklı fırın sıcaklıkları (200, 220, 240 °C) ve pişme sürelerinde (20, 25, 30 dk) ekmekler üretilmiştir. Vitamin katkısının ekmeğin kalite özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Farklı proses koşullarında üretilen ekmeklerin anılan B vitamini miktarları ters faz HPLC metotları kullanılarak belirlenmiştir.

Gözenek yapısı ve ekmek içi renkleri açısından karşılaştırıldığında vitamin katkılı ekmeklerin vitamin katkısız kontrol ekmeği ile genel olarak benzer özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Pişme süresinin artmasıyla beraber ekmek örneklerinin yumuşaklık değerinin azaldığı görülmüştür.

Ekmeğin görsel kalite kriterleri arasında en belirleyici özelliklerden bir tanesi olan renk özelliği ekmeklerin üst kabuk, yan kabuk ve iç kısımlarının renk değerlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle saptanmıştır. Üst ve yan kabukta fırın sıcaklığının artması ile genel olarak parlaklık (L^*) değerlerinin azaldığı, kırmızılık (a^*) değerlerinin arttığı, sarılık (b^*) değerlerinin değişmediği, pişme süresinin artması ile ise L^* renk değerlerinin azaldığı, a^* ve b^* renk değerlerinin genel olarak değişmediği saptanmıştır. Ekmek içi örnekleri incelendiğinde ise fırın sıcaklığı ve pişme süresinin artması ile L^* renk değerlerinin değişmediği, sadece aynı koşullarda üretilen vitamin katkısız kontrol ekmeğine göre vitamin katkılı ekmeğin a^* ve b^* renk değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Bu durum vitamin katkısının ekmeklerde kırmızılığın göstergesi olan a^* renk değeri üzerinde etkili olduğunu, ekmek içi sarılığını ise beklenildiği gibi arttırdığını göstermektedir.

Ekmeklerin B vitamini miktarlarının HPLC metotları kullanılarak yapılan analizleri sonucunda geri kazanım oranları tiamin için % 94, riboflavin için % 95, niasin için % 95, piridoksin için % 89, folik asit için ise % 98 olarak saptanmıştır. Ekmek örneklerindeki tiamin, riboflavin ve niasin miktarları standart AACC metotları ile de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar HPLC yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve yöntemler arasında yüksek korelasyonlar elde edilmiştir (tiamin için

$R^2=0.941$, riboflavin için $R^2=0.963$, niasin için $R^2=0.891$). Bunun yanısıra sertifikalı referans materyallerindeki vitamin miktarları da HPLC metotları ile saptanmış ve elde edilen verilerin referans materyalleri için belirtilen kabul sınırları içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

Ekmek üretim sürecinde proses koşullarından pişme süresi ve fırın sıcaklığının vitamin kayıpları üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla ekmek örneklerinde B vitamini analizleri tüm ekmek, ekmek içi ve kabuğunda gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Ekmek örneklerinin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğundaki tiamin miktarında fırın sıcaklığı ve pişme süresinin artması ile meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). İncelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum ($200\text{ }^\circ\text{C}$, 20 dk) ve maksimum ($240\text{ }^\circ\text{C}$, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmek tiamin değerleri arasında % 16.6'lık azalma olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra, vitamin katkılı hamurda fermentasyon ile tiamin miktarında % 38.9 oranında artış meydana geldiği saptanmıştır.

Riboflavin miktarları incelendiğinde ise her üç pişme süresi değerinde üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda fırın sıcaklığındaki artış ile riboflavin miktarlarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Genel olarak pişme sürelerindeki artışa bağlı olarak riboflavin miktarları arasında da istatistiksel olarak önemli oranda azalma saptanmıştır. İncelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum ($200\text{ }^\circ\text{C}$, 20 dk) ve maksimum ($240\text{ }^\circ\text{C}$, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmek riboflavin değerleri arasında % 34.2'lik azalma olduğu saptanmıştır.

Ekmek örneklerindeki niasin miktarı incelendiğinde, her üç pişme süresinde üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda niasin değerleri arasında genel olarak fırın sıcaklığındaki artışa bağlı olarak istatistiksel olarak önemli oranda azalma belirlenmiştir ($p<0.05$). Fakat genel olarak pişme süresinin ekmek örneklerinin niasin miktarları üzerinde fazla etkisinin olmadığı görülmüştür. Çalışma kapsamında incelenen pişme süresi ve fırın sıcaklığının minimum ($200\text{ }^\circ\text{C}$, 20 dk) ve maksimum ($240\text{ }^\circ\text{C}$, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin niasin değerleri arasında

% 16.1'lik azalma olduğu saptanmıştır. Vitamin katkılı un ile fermentasyondan sonra hamur örneğindeki niasin miktarları incelendiğinde fermentasyon ile % 3.7 oranında artış meydana geldiği görülmüştür.

Çalışılan her üç pişme süresi değerinde üretilen ekmeklerin tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğunda fırın sıcaklığındaki artış ile piridoksin miktarlarında genel olarak meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm ekmek, ekmek içi ve ekmek kabuğu kısımlarında 200 C fırın sıcaklığında pişme sresindeki artışa bağlı olarak piridoksin miktarlarında istatistiksel olarak önemli bir değişim saptanmamış, 220 C ve 240 C fırın sıcaklıklarında genel olarak azalma belirlenmiştir. İncelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200 C, 20 dk) ve maksimum (240 C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin piridoksin değerleri arasında % 32.8'lik azalma olduğu görülmüştür.

Genel olarak incelendiğinde pişme süresinin ve fırın sıcaklığının ekmek örneklerinin folik asit içerikleri üzerine önemli etkisinin bulunmadığı söylenebilmektedir. Çalışma kapsamında incelenen fırın sıcaklığı ve pişme süresinin minimum (200 C, 20 dk) ve maksimum (240 C, 30 dk) değerlerinde üretilen tüm ekmeklerin folik asit değerleri arasında % 10.1'lik azalma olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar fermentasyon sırasında hamurdaki folik asit miktarının arttığını, pişme işlemi ile azaldığını göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, çalışılan proses koşullarında B vitamini kayıplarının en fazla ekmek kabuğunda, en az oranda ise ekmek içinde meydana geldiği saptanmıştır. Fırın sıcaklığının artması ile ekmek örneklerindeki tiamin, riboflavin, niasin ve piridoksin miktarlarının azaldığı belirlenmiştir. Pişme süresinin artışının ekmeklerin niasin miktarı üzerinde fazla etkisi görülmezken tiamin, riboflavin ve piridoksin miktarlarında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Fırın sıcaklığı ve pişme sresindeki artışın ekmeklerin folik asit miktarı üzerine önemli etkisinin olmadığı da saptanmıştır. Ekmek yapım prosesi sonucunda incelenen her vitaminin miktarının una göre azaldığı saptanmakla beraber, fermentasyon ile genel olarak vitamin miktarlarının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda vitamin kaybı en az olacak şekilde ekmek yapım proses koşullarının optimize edilebileceği ve

insan sağlığını olumsuz etkilemeyecek oranda yüksek besleyici değere sahip ekmeklerin elde edilebileceği düşünülmektedir.

Gıda zenginleştirme konusunun önemli diğer bir boyutu denetimlerin uygun yöntemlerle sürdürülmesidir. Bu çalışmada bu yöntemlerle ilgili ekmekte ayrıntılı analizler yapılarak karşılaştırmalı olarak verilmiş ve en iyi sonuç veren yöntemler saptanmıştır. Farklı gıda maddelerinde mikro besin öğelerinin analizinde özellikle ekstraksiyon aşaması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada sadece ekmek için farklı yöntemler denenerek en iyi sonuç veren analiz yöntemleri saptanmıştır. Farklı gıda matrislerinde de benzer şekilde yoğun araştırmaların sürdürülmesinin gerektiği ve bu konuda daha çok veriye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- AACC, 1990, American Association of Cereal Chemists, Approved methods of the AACC, 8th Edition, The Association, St. Paul, MN.
- AACC, 2000, American Association of Cereal Chemists, Approved methods of the AACC, 10th Edition, The Association, St. Paul, MN.
- Abdel-Kader, 1992, Comparison of AOAC and high-performance liquid chromatographic methods for tiamin determination in foods. Food Chemistry, 43, 393-397.
- Alltech, 2005, Alltech Chromatography, Columns, Instruments, Accessories, Catalog 600, USA, p 495.
- AOAC, 1990, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, The Association, Arlington, VA, USA.
- Arcot J., Shrestha A.K., Gusanov U., 2002, Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. Food Control, 13, 245-252.
- Arella F., Lahély S., Bourguignon J.B., Hasselmann C., 1996, Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study. Food Chemistry, 56, 1, 81-86.
- Ball G.F.M., 2006, Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability. CRC Press, ISBN 1-57444-804-8.
- Batifoulier F., Verny M. –A., Chanliaud E., Rémésy C., Demigné C., 2005, Effect of different baking methods on thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread. Journal of Cereal Science, 42, 101-108.
- Batifoulier F., Verny M. –A., Chanliaud E., Rémésy C., Demigné C., 2006, Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. European Journal of Agronomy, 25, 163-169.
- Baysal A., 2002, Beslenme, Hatiboğlu Yayinevi, ISBN 975-7527-73-4, Ankara.
- Bergaentzlé M., Arella F., Bourguignon J.B., Hasselmann C., 1995, Determination of vitamin B6 in foods by HPLC – a collaborative study. Food Chemistry, 52, 81-86.
- Blake C.J., 2007, Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 389, 63-76.
- Bognår A. and Ollilainen V., 1997, Influence of extraction on the determination of vitamin B₆ in food by HPLC. Z Lebensm Unters Forsch A, 204, 327-335.
- Chase G. W. Jr, Landen W. O. Jr, Soliman Abdel-Gawad M., Eitenmiller R. R., 1993. Liquid Chromatographic Analysis of Niacin in Fortified Food Products. Journal of AOAC International, Vol 76, No 2, 390-393.

- Cheng Z.J., Hardy R.W., 2003, Effect of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficient of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 9:77-83.
- Cho C. M., Ko J.H., Cheong W.J., 2000, Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction. *Talanta*, 51, 799-806.
- Coppock, J.B.M., Carpenter B.R., Knight R.A., 1957, Thiamine losses in bread baking. *Chem. Ind., London*. 23: 735-736. (*Food Science Abst.* 2599, vol 29)
- Cort W.M., Borenstein B., Harley J.H., Osadca M., Scheiner J., 1976, Nutrient stability of fortified cereal products. *Food Technology*, 30, 4, 52.
- Çelik S., 2006, Gıda Kimyası Ders Notları (basılmamış), Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Dang J., Arcot J., Shrestha A., 2000, Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry*, 68, 295-298.
- Darnton-Hill I, Nalubola R. 2002, Fortification strategies to meet micronutrient needs: successes and failures. *Proceedings of Nutrition Society*, 61:231-241.
- Devi R., Arcot J., Sotheeswaran S., Ali S., 2008, Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method. *Food Chemistry*, 106, 1100-1104.
- DPT, 2003, T. C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı, Ulusal Gıda Ve Beslenme Stratejisi Çalışma Grubu Raporu (Ulusal Gıda Ve Beslenme Eylem Planı I. Aşama Çalışması Eki İle) İktisadi Sektörler Ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü, Mart 2003, Yayın No DPT: 2670, 101s.
- Eitenmiller R.R. and Landen W.O., 1999, *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*, CRC Press, New York.
- Ekinci R., 2005, The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. *Food Chemistry*, 90, 127-132.
- Engelhardt R. and Gregory J.F., III, 1990, Adequacy of enzymatic deconjugation in quantification of folate in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 154-158.
- Erbaş M., Certel M., Uslu M.K., 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry*, 89, 341-345.
- Esteve M., Farré R., Frígola A., García-Cantabella J., 2001, Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Mushrooms by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1450-1454.
- FAO/WHO, 1992, "World Declaration and Plan of Action for Nutrition. 1992". International Conference on Nutrition, Rome (ICN/92/2).
- FAO/WHO, 1994, *Codex Alimentarius*, Volume 4.

- FAO. Nutrition Education for the Public. FAO Food and Nutrition Paper 59, Rome, 1995.
- FAO/ILSI, 1997, Preventing Micronutrient Malnutrition: A Guide to Food-based Approaches. A Manual for Policy Makers and Programme Planners.
- Finglas P.M. and Faulks R.M., 1984, The HPLC Analysis of Thiamin and Riboflavin in Potatoes. *Food Chemistry*, 15, 37-44.
- Finglas P.M., 1993, Recent Developments in the Determination of Water-Soluble Vitamins in Food-Impact on the Use of Food Composition Tables for the Calculation of Vitamin Intakes. Quality and Accessibility of Food-Related Data, Proceedings of the First International Food Data Base Conference, Sydney, Australia, 22-24 September 1993.
- Finglas P.M., Van den Berg H., de Froidmont-Görtz I., 1996, Improvements in determination of vitamins in foods: method intercomparison studies and preparation of certified reference materials (CRMs). *Food Chemistry*, 57, 1, 91-94.
- Finglas P.M., Wigertz K., Vahteristo L., Witthöft C., Southon S., de Froidmont-Görtz I., 1999, Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally occurring folates in food, *Food Chemistry*, 64, 245-255.
- Fletcher R. J., Bell I. P., Lambert J. P., 2004, Public health aspects of food fortification: a question of balance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 605-614.
- Freisleben A., Schieberle P., Rychlik M., 2003. Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 315, 247-255.
- Gatti R. and Gioia M.G., 2005, Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B₆ vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 538, 135-141.
- Gliszczynska-Swiglo A., 2007, Folates as antioxidants. *Food Chemistry*, 101, 1480-1483.
- Goli D.M. and Vanderslice J.T., 1992, Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate, *Food Chemistry*, 43, 57.
- Gregory J.F., 1989. Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Folates. *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 33, 1-101, John E. Kinsella (ed.), Academic Press, Inc., San Diego.
- Gregory J.F., 1996. Vitamins. *Food Chemistry*. Owen R. Fennema (ed.). 3rd edition, Marcel Dekker, Inc. New York, ISBN 0-8247-9691-8.

- Gujska E. and Majewska K., 2005, Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Folates Stability in Wheat and Rye Breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 37-42.
- Gujska E. and Kuncewicz A., 2005, Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *European Food Research and Technology*, 221, 208-213.
- Hanninen S.A., Darling P.B., Sole M.J., Barr A., Keith M.E., 2006, The Prevalence of Thiamin Deficiency in Hospitalized Patients With Congestive Heart Failure. *Journal of The American College of Cardiology*, 47, 2, 354-361.
- Hollman P.C.H., Slangen J.H., Wagstaffe P.J., Faure U., Southgate D.A.T., Finglas P.M., 1993, Intercomparison of methods for the determination of vitamins in foods. Part 2.*Water-soluble vitamins, *Analyst*, 118, 481-488.
- ICC, 2002, International Association for Cereal Science and Technology, Standard Methods of the ICC, Printed by ICC-Vienna, Australia.
- Jastrebova J., Witthöft C., Grahn A., Svensson U., Jägerstad M., 2003, HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry*, 80, 579-588.
- Joshi R., Adhikari S., Patro B.S., Chattopadhyay S., Mukherjee T., 2001, Free Radical Scavenging Behavior of Folic Acid: Evidence for Possible Antioxidant Activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 12, 1390–1399.
- Juraja S.M., Trenerry V.C., Millar R.G., Scheelings P., Buick D.R., 2003, Asia Pacific food analysis network (APFAN) training exercise: the determination of niacin in cereals by alkaline extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 93-106.
- Kariluoto M.S., Vahteristo L.T., Piironen V.I., 2001, Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 938-942.
- Kariluoto S., Vahteristo L., Salovaara H., Katina K., Liukkonen K., Piironen V., 2004, Effect of Baking Method and Fermentation on Folate Content of Rye and Wheat Breads. *Cereal Chemistry*, 81, 1, 134-139.
- Kall M.A., 2003, Determination of total vitamin B₆ in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry*, 82, 315-327.
- Keagy P.M., Stokstad E.L.R., Fellers D.A., 1975, Folacin stability during bread processing and family flour storage. *Cereal Chemistry*, 52, 348-356.
- Kloosterman J., Fransen H. P., Stoppelaar J., Verhagen H., Rompelberg C., 2007, Safe addition of vitamins and minerals to foods: setting maximum levels for fortification in the Netherlands. *European Journal of Nutrition*, 46:220–229.

- Köksel H., Sivri S., Özboy Ö., Başman A., Karacan H., 2000, Hububat Laboratuvarı El Kitabı, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Yayın No: 47, ISBN 975-491-092-8, Ankara.
- Krishnan P.G., Mahmud I., Matthees D.P., 1999, Postcolumn fluorimetric HPLC procedure for determination of niacin content of cereals. *Cereal Chemistry*, 76, 4, 512-518.
- Lahély S., Bergaentzlé M., Hasselmann C., 1999, Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry*, 65, 129-133.
- Lásztity R., 1999, *The Chemistry of Wheat in Cereal Chemistry*, Hungary, ISBN 963 05 7626 0, 111 p.
- Lynch P.L.M. and Young I.S., 2000, Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 267-284.
- Maberly G.F., 2002. Enriching lives through national flour fortification. A Policy Planning Forum with the Wheat Industry to explore the launch of a global Public-Private Initiative supporting Universal Flour Fortification, Mauritius, October, 20p.
- Maleki, M. and Dagher, S., 1967. Effect of baking on retention of thiamin, riboflavin and niacin in Arabic bread. *Cereal Chemistry*, 44, 483-487.
- Marshall P.A., Vandeppeer J.M., Pant I., Trenerry V.C., Scheelings P., Buick D.R., 1997, The development and evaluation of secondary food reference materials for the determination of cholesterol, fatty acids and selected water-soluble vitamins in foods. *Food Chemistry*, 58, 3, 269-276.
- Mauro D.J. and Wetzel D.L., 1984, Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in enriched cereal based products by high-performance liquid chromatography using selective detection. *Journal of Chromatography*, 299, 281-287.
- Mawatari K., Inuma F., Watanabe M., 1991, Determination of nicotinic acid and nicotinamide in human serum by high-performance liquid chromatography with postcolumn ultraviolet-irradiation and fluorescence detection. *Analytical Sciences*, 7, 733-736.
- Moreno P. and Salvadó V., 2000, Determination of eight water- and fat- soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870, 207-215.
- Morgan A.F. and Frederick H., 1935, Vitamin B (B₁) in bread as affected by baking. *Cereal Chemistry*, 12, 390-401.
- Morrison L.A. and Driskell J.A., 1985, Quantities of vitamin B₆ vitamers in human milk by high-performance liquid chromatography, Influence of maternal vitamin B₆ status. *Journal of Chromatography*, 337, 249-258.

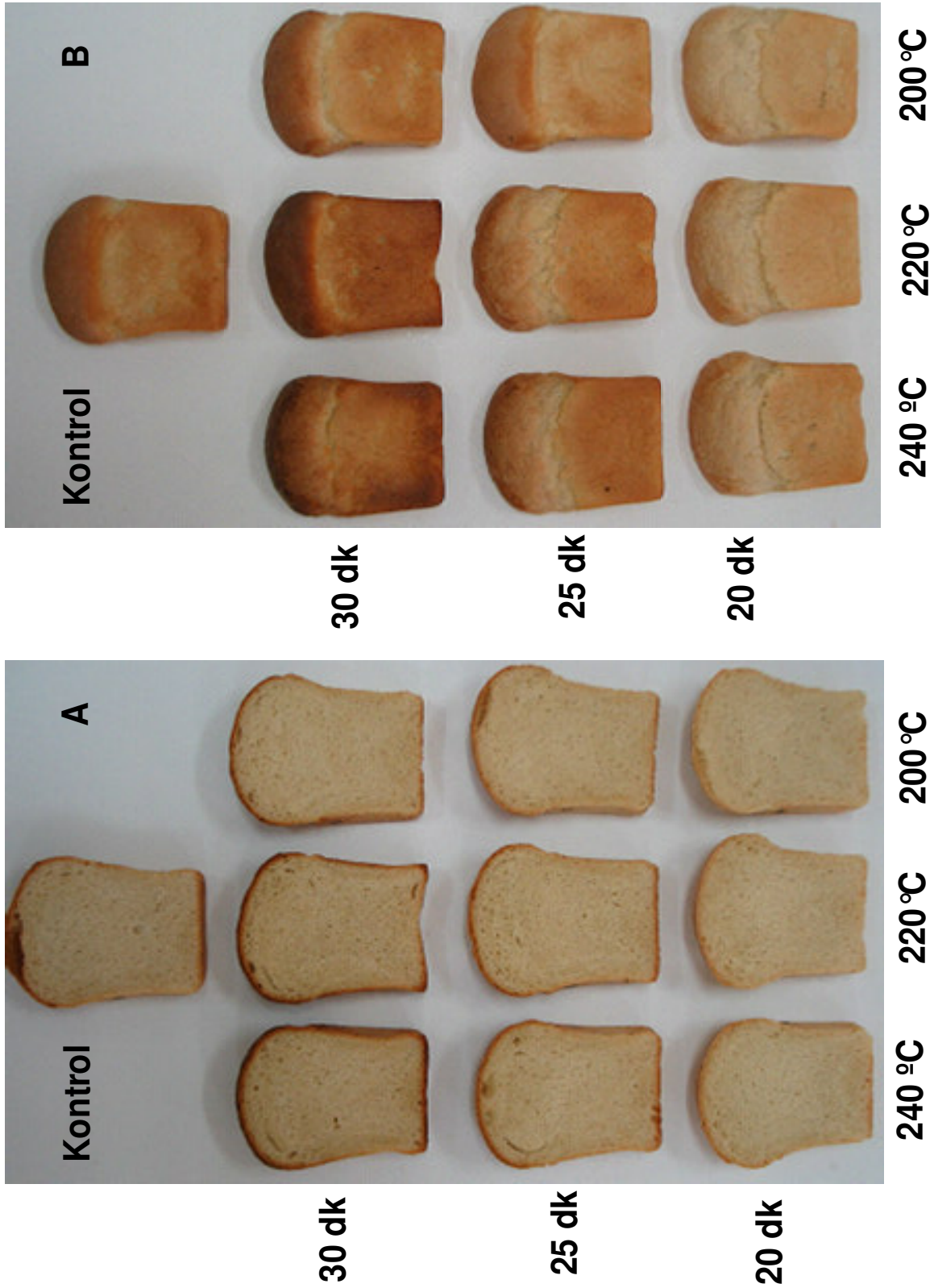
- Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C., 2000, Extraction procedures for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. *Food Chemistry*, 71, 129-138.
- Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C., 2002, Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry*, 78, 129-134.
- Neuhouser M.L. and Beresford S.A.A., 2001, Folic acid: Are current fortification levels adequate? *Nutrition*, 17, 868-872.
- Olds S.J., Vanderslice J.T., Brochetti D., 1993, Vitamin B₆ in raw and fried chicken by HPLC. *Journal of Food Science*, 58, 3, 505 -507.
- Ollilainen V., Finglas P.M., van den Berg H., de Froidmont-Görtz I., 2001, Certification of B-group vitamins (B₁, B₂, B₆ and B₁₂) in four food reference materials, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 315-321.
- Ortiz-Monasterio J.I., Palacios-Rojas N., Meng E., Pixley K., Trethowan R., Pena R.J., 2007, Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science*, 46, 293–307.
- Osseyi E.O., Wehling R.L., Albrecht J.A., 2001. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking, *Cereal Chemistry*, 78(4), 375-378.
- Özkaya, H. ve Kahveci, B., 1990, Tahıl ve Ürünleri Analiz Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 14, Ankara, s. 90.
- Özkaya B. ve Özkaya H., 1992, Ekmek Zenginleştirmede Dozlama Alternatifleri ve Sistemleri. Beslenme ve Uygulama Açısından Ekmeğin Zenginleştirilmesi. 29-30 Haziran 1992, Best Otel, Ankara.
- Özkaya B. ve Özkaya H., 1999. Zenginleştirilmiş ekmeğin vitamin değerini etkileyebilecek bazı faktörler ve zenginleştirme amacıyla katılan vitamin ve minerallerin kaliteye etkileri üzerinde araştırma, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(20), 44-59.
- Ötleş S. and Karaibrahimoglu Y., 2005, Analysis of Vitamins for the Health, Pharmaceutical, and Food Sciences. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. Semih Ötleş (ed.) Taylor&Francis, London.
- PAHO/WHO (Pan American Health Organization, World Health Organization), 1998. Interagency Meeting: Iron Fortification in the Americas. PAHO/HPP/HPN/98.03. Washington, DC.
- Pekcan G., 1998, Türkiye’de Beslenme Durumu. 5. Uluslararası Spor Bilimleri Kongresi Bildiri Özetleri, Ankara, 5-7 Kasım 1998, 51-53.
- Pekcan G., 2006, Food and nutrition policies: what’s being done in Turkey. *Public Health Nutrition*: 9(1A), 158–162.

- Pfeiffer C.M., Rogers L.M., Gregory III J.F., 1997, Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 407-413.
- Phillips K.M., Ruggio D.M., Ashraf-Khorrasani M., Haytowitz D.B., 2006. Difference in folate content of green and red sweet peppers (*Capsium annuum*) determined by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9998-10002.
- Poletti S., Gruissem W., Sautter C., 2004, The nutritional fortification of cereals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 162-165.
- Póo-Prieto R., Haytowitz D.B., Holden J.M., Rogers G., Choumenkovitch S.F., Jacques P.F., Selhub J., 2006. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products, *The Journal of Nutrition*, 3079-3083.
- Position of The American Dietetic Association (ADA), 1994, "Enrichment and Fortification of Food and Dietary Supplements. *Journal of the American Dietetic Association*, 94, 661.
- Ranhotra G.S. and Gelroth J.A., 1986, Stability of Enrichment Vitamins in Bread and Cookies. *Cereal Chemistry*, 63, 5, 401-403.
- Ranum P.M., 2000, Cereal Enrichment and Nutrient Labeling in *Handbook of Cereal Science and Technology*, 2nd edition, Ed. by Karel Kulp and Joseph G. Ponte, CRC Press, ISBN 0-8247-8294-1, New York, 697-705.
- Rasmussen S. E., Andersen N. L., Dragsted L. O., Larsen J. C., 2006, A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *European Journal of Nutrition*, 45: 123–135.
- Reitzer-Bergaentzle M., Marchioni E., Hasselmann C., 1993, HPLC determination of vitamin B₆ in foods after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamers into pyridoxol. *Food Chemistry*, 48, 321-324.
- Riccio F., Mennella C., Fogliano V., 2006, Effect of cooking on the concentration of vitamins B in fortified meat products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1592-1595.
- Rivlin R.S., 1975. *Riboflavin*. Plenum Press, ISBN 0-306-30814-2. New York and London.
- Rizzolo A. And Polesello S., 1992, Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography*, 624, 103-152.
- Rose-Sallin C., Blake C.J., Genoud D., Tagliaferri E.G., 2001, Comparison of microbiological and HPLC-fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chemistry*, 73, 473-480.
- Rubin S.H., Emodi A. and Scialpi L., 1977, Micronutrient additions to cereal grain products. *Cereal Chemistry*, 54, 4, 895-904.

- Sampson D.A., Eoff L.A., Yan X.L., Lorenz K., 1995, Analysis of free and glycosylated vitamin B6 in wheat by high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry*, 72, 2, 217-221.
- Schultz, A.S., Atkin L., Frey C.N., 1942, The stability of vitamin B1 in the manufacture of bread. *Cereal Chemistry*, 19, 532.
- Shuey W.C., 1984, Interpretation of farinogram ChV in the *The Farinograph Handbook*, Third edition, B.L.D'Appolania and W.H.Kunerth (eds.), AACC Inc, St. Paul, MN, USA, 64 p.
- Sierra I., Vidal-Verde C., 1997, A simple method to determine free and glycosylated vitamin B6 in legumes. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(6), 957-969.
- Skurray G. R., 1981. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamine in foods. *Food Chemistry*, 7, 77-80.
- Tabekhia M.M. and D'Appolania, 1979, Effects of processing steps and baking on tiamine, riboflavine and niacin levels in conventional and continuous produced bread. *Cereal Chemistry*, 56, 2, 79-81.
- Tanphaichitr, V., 2001, Thiamine. Ruker, R.B., Suttie, J. (eds.). *The Handbook of Vitamins*, third edition, Marcel Dekker, Inc, New York, 275-310 p.
- Thorn, J.A., Ross J.W., 1960, Determination of yeast growth in doughs. *Cereal Chemistry*, 37, 415.
- Tunçbilek E., Boduroğlu K., Alikeşifoğlu M., 1999, Neural Tube Defects in Turkey: Prevalence, Distribution and Risk Factors. *The Turkish Journal Pediatrics*, 41: 299-305.
- Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği, 2002. TGK Tebliğ No. 2002/58, EK 2.
- Tyler T.A. and Genzale J.A., 1990, Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina, and cottage cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73, 3, 467-469.
- Vahteristo L.T., Ollilainen V., Koivistoinen P.E., Vara P., 1996, Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 477.
- Van den Berg H., van Schaik F., Finglas P.M., Froidmont-Görtz I., 1996, Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in foods by HPLC. Collaborative study, *Food Chemistry*, 57, 101-108.
- Van Niekerk P.J., Smit S.C.C., Strydom E.S.P., Armbruster G., 1984, Comparison of a High-Performance Liquid Chromatographic and Microbiological Method for the Determination of Niacin in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 304-307.

- Van Veen A.G., Steinkraus K.H., 1970, Nutritive value and whole-someness of fermented food. *Journal of Food Science and Agriculture*, 18, 576-580.
- Viñas P., Balsalobre N., López-Erroz C., Hernández-Córdoba M., 2004, Determination of vitamin B₆ compounds in foods using liquid chromatography with post-column derivatization fluorescence detection. *Chromatographia*, 59, March (No. 5/6).
- Welch R.M. and Graham R.D., 2002, Breeding crops for enhanced micronutrient content. *Plant and Soil*, 245, 205-214.
- Wetherilt H., Açıkturk F., Brubacher G., Okan B., S. Aktas, Turdu S., 1992, Blood vitamin and mineral levels in 7-17 years old Turkish children. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 62, 21-29.
- White D.R., 1990, Determination of 5-methyltetrahydrofolate in citrus juice by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1515-1518.
- Wimalasiri P. and Wills B.H., 1985, Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 318, 412-416.
- Windahl K.L., Trenerry V.C., Ward C.M., 1998, The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction. *Food Chemistry*, 65, 263-270.

EK 1. Farklı proses koşullarında üretilen zenginleştirilmiş ekmekler (**A:** İç, **B:** Kabuk)
(Kontrol ekmeği: vitamin katkısız, 220 °C'de 25 dk pişirilmiştir.).



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Berna BİLGİ BOYACI

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1975

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Özel Arı Lisesi, Ankara, 1990-1993

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, 1994-1998

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi:

Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2000-.