

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

PROTEİNİ AZALTILMIŞ KAKAO TOZU ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Könül MEHDİZE

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Omca DEMİRKOL

Mayıs 2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNİ AZALTILMIŞ KAKAO TOZU ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Könül MEHDİZE

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 25.04.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr.
Omca DEMİRKOL
Jüri Başkanı

Doç. Dr.
Oktay YEMİŞ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi
Özlem AKTÜRK GÜMÜŞAY
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Könül MEHDİZE

15.10.2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hem ders döneminde, hem tez çalışmamda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımda bulunan, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Omca Demirkol'a teşekkürlerimi sunarım. Özellikle tüm laboratuvar çalışmalarım boyunca sabırla, anlayışla yardımını esirgemeyen, engin birikimlerini benimle paylaşan, tezimin baştan sona yürütülmesinde emeği olan Arş. Gör. Dr. İnci Cerit'e teşekkür ederim.

Ayrıca, tüm hayatım boyunca hatta mesafelere rağmen yanımda olan babam Mövlüş Mehdiyev'e, annem Meşuqe Mehdiyeva'ya ve kardeşlerime teşekkür ederim. Lisans üstü devam etmek için Türkiye'ye gelme fikrimden , tez savunmama kadar olan tüm süreçte beni asla yalnız bırakmayan, her zaman cesaretlendiren, maddi ve manevi hep destek olan Baku Medical Plaza Hastanesi'nin Anesteziyoloji ve Reanimasyon bölüm başkanı Dr. Kamal Quliyev'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No:2021-7-24-27) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Kakao (Theobroma cacao).....	6
2.1.1. Kakao çekirdeğinin üretimi.	8
2.2. Kakao Ürünlerinin Üretimi.....	14
2.2.1. Kakao tozu ve kako yağı	14
2.2.2. Çikolata ve çikolatanın üretimi	16
2.2.3. Çikolata	21
2.2.4. Kakao ve çikolatanın sağlık üzerindeki etkileri.	24
2.3. Fenilketonüri (Penilketonuria PKU).....	27
2.3.1. Fenilketonuria hastalığının tarihçesi, tanı ve belirtileri.	29
2.3.2. PKU'nin dünyada ve türkiyede görülme sıklığı	31
2.4. Fenilketonüri (PKU) Hastaları İçin Tedavi Yöntemleri.....	33
2.4.1. Fenilketonüri (PKU) hastaları için gıda üretim metotları	36

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler.....	40
3.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler.....	41
3.2.3. Düşük proteinli kakao tozu üretimi.....	42
3.2.3.1. Püskürterek kurutma.....	45
3.2.4. Laboratuvar analizleri.....	46
3.2.4.1. Çözünürlük analizi.....	46
3.2.4.2. Şeker analizi.....	46
3.2.4.3. Protein analizi.....	47
3.2.4.4. Amino asit profil analizi.....	48
3.2.4.5. Antioksidan analizleri için örneklerin ekstraksiyonu.....	49
3.2.4.6. DPPH radikal süpürme aktivitesi.....	49
3.2.4.7. Demir iyonu indirgeme potansiyeli (FRAP).....	50
3.2.4.8. Toplam fenolik madde tayini (TFM).....	50
3.2.5. Çikolata üretimi.....	51
3.2.5.1. Çikolatada renk analizi.....	53
3.2.6. İstatistiksel analizler.....	53

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	54
4.1. Kakao Tozunda Şeker (Glikoz,Fruktoz) Kompozisyonu Ve Çözünürlük Oranı.....	54
4.2. Kakao Tozunun Protein İçeriği.....	61
4.3. Kakao Tozunun Amino Asit (AA) İçeriği.....	64
4.4. Kakao Tozunun Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Madde İçeriği.....	68
4.4.1. DPPH radikal süpürme aktivitesi.....	69
4.4.2. Demir iyonu indirgeme potansiyeli (FRAP).....	71
4.4.3. Toplam fenolik madde tayini.....	72

4.5. Çikolata rneklerinin Renk Değerleri.....	74
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	104



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Amino asit
BH4	: (6R)-1-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin
DHPR	: Dihidropteridin redüktaz
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazi
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
FRAP	: Demir iyonu indirgeme potansiyeli
GMP	: Glikomakropeptid
HPA	: Hiperfenilalaninemi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IMD	: Kalıtsal metabolik bozukluklar
K	: Kontrol kakao tozu
KKÇ	: Kontrol grup çikolata
LNAA	: Büyük nötr amino asitler
MD	: Maltodekstrin
NO	: Nitrik oksid
PAH	: Fenilalanin hidroksilaz
Phe	: Fenilalanin
PK	: Proteini azaltılmış kakao tozu
PKÇ	: Proteini azaltılmış çikolata
PKU	: Fenilketonüri
qBH 2	: Kininoid dihidrobiopterin
TFM	: Toplam fenolik madde
Tyr	: Tirozin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kakao çekirdeklerinin fermantasyon sürecinde renk değişimleri (Brach ve ark., 2016).....	10
Şekil 2.2. Kakao çekirdeklerinin işlenmesi sonucu kakao liköründen kaka tozu, kakao yağı ve çikolatanın oluşması (Aprotosoie ve ark., 2016).	16
Şekil 2.3. Çikolatanın üretim aşamaları (Afoakwa, 2014).....	17
Şekil 2.4. Çikolata temperlemenin temel aşamaları (Afoakwa, 2014).	19
Şekil 2.5. Kakao Metilksantin bileşikleri (Ishaq ve Jafri, 2017).....	26
Şekil 2.6. Fenilalaninin tirozine dönüşüm reaksiyonu (Kim ve ark., 2004).	28
Şekil 2.7. İnsanda fenilalanin metabolizmasının yolu (Kaufman, 1989).....	29
Şekil 2.8. PKU hastalığının otozomal resesif genetik çaprazlama sonucu geçişi (Anonim, 2018).	32
Şekil 3.1. Caco Barry (Extra Brute), Ham kakao tozu.....	40
Şekil 3.2. Proteini azaltılmış kakao tozunun üretim aşamaları.	45
Şekil 3.3. İki farklı kakao tozundan çikolata üretimi.	52
Şekil 4.1. Glikoz analizi için oluşturulan standart eğri.	56
Şekil 4.2. Fruktoz analizi için oluşturulan standart eğri.	56
Şekil 4.3. Kontrol kakao tozu örneklerinin şeker içeriğine ait kromatogram görüntüsü	58
Şekil 4.4. Düşük proteinli kakao tozu örneklerinin şeker içeriğine ait kromatogram görüntüsü	58
Şekil 4.5. Kakao tozunun protein içeriği.	63
Şekil 4.6. DPPH analizi için oluşturulan standart eğri.....	70
Şekil 4.7. FRAP analizi için oluşturulan standart eğri.	71
Şekil 4.8. Gallik asit analizi için oluşturulan standart eğrisi.....	73

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Kakao tozunun şeker (glikoz, fruktoz) değerleri.	57
Tablo 4.2. Kakao tozunun çözünürlük değerleri.	60
Tablo 4.3. Kakao süspansiyonunun protein oranındaki % azalma	64
Tablo 4.4. Kakao tozu örneklerinin amino asit değerleri.	66
Tablo 4.5. Kakao örneklerinin DPPH değerleri.	71
Tablo 4.6. İki farklı kakao örneğinin FRAP değerleri	72
Tablo 4.7. İki farklı kakao örneklerinin TFM değerleri.	73
Tablo 4.8. Çikolata örneklerinin renk değerleri	75

ÖZET

Anahtar kelimeler: fenilketonüri (PKU), kakao tozu, düşük proteinli kakao, antioksidan aktivite, püskürtterek kurutma

Bu çalışmada, yüksek protein içeriğine sahip popüler bir gıda olan kakao tozunun yağ ve protein oranı azaltılmış, PKU hastalarının tüketebileceği ürünlerden biri olan düşük proteinli çikolata haline getirilmesi amaçlanmıştır. Kakao proteinleri, ilk önce 500C'de Amilazla, ardından 55-600C'de Viskozim ve Alkalaz ile enzimatik yöntemle hidrolize edilmiştir. Daha sonra, izoelektrik çöktürme ile farklı pH'larda (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) protein seviyeleri düşürülmüştür ve protein oranı düşürülen kakao konsantre sıvısı püskürtülerek kurutulmuştur. Böylelikle kakao tozunun % protein, çözünürlük ve şeker (glukoz, fruktoz) oranı belirlenmiştir. Kontrol kakao tozu ve düşük proteinli kakao tozu şeklinde iki farklı çikolata üretilmiştir. Her iki çikolata örneklerine renk, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde içeriği, DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikalini giderme aktivitesi, demir iyonu indirgeme potansiyeli analizleri uygulanmıştır. Ayrıca çikolata örneklerinin amino asit (AA) içerikleri belirlenmiştir.

Yapılan analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kakao tozunun çözünürlüğü %28.61'den %50.69'a kadar yükselmiş olduğu tespit edilmiştir. Kakao tozunun izoelektrik çöktürme ile protein içeriğindeki azalma en iyi pH:3.5 belirlenmiştir. pH:3.5'de protein oranında %38.61 azalma tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde, DPPH ve FRAP değerleri kontrol grup çikolataya nazaran düşük protein içeriğine sahip çikolata örneklerinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Protein oranını azaltmak için yapılan işlemlerin çikolatanın renk değerleri L^* , a^* ve b^* üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir. ($P<0.05$). Kontrol numunesinde HPLC-RID dedektörü ile çözünür şeker tespit edilmemesine rağmen, glukoz ve fruktoz miktarı 100 g düşük proteinli kakao tozunda 23.33 g glukoz ve 3.55 g fruktoz olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada esansiyel (EAA) ve esansiyel olmayan (NEAA) toplam 19 adet amino asit tespit edilmiştir. Fenilalanin içeriği mg/100 g kontrol numunede 162.80 ± 0.95 , düşük proteinli çikolata örneklerinde ise 138.19 ± 2.11 belirlenmiş ve çalışma sonunda fenilalanin oranının % 15.12 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Özet olarak, bu çalışma PKU hastalarının tüketimine yönelik sürdürülebilir gıda üretiminin amacını oluşturan düşük protein içerikli ürün eldesi açısından değerlendirildiğinde; normal bitter çikolata örneklerinden %38 oranında daha düşük protein içeriğine sahip bitter çikolata üretimi gerçekleştirilmiştir.

PRODUCTION OF REDUCED PROTEIN COCOA POWDER

SUMMARY

Keywords: phenylketonuria (PKU), cocoa powder, low chocolate, antioxidant, spray drying

In this study, it was aimed to transform cocoa powder, which is a popular food with high protein content, into low-protein chocolate, which is one of the products that PKU patients can consume with reduced fat and protein. Cocoa proteins were hydrolyzed first with Amylase at 50°C, then with Viscozyme and Alkalase at 55-60°C by enzymatic method. Then, protein levels were reduced at different pHs (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) by isoelectric precipitation, and the protein-reduced cocoa concentrate liquid was spray-dried. Thus, the % protein, solubility and sugar (glucose, fructose) ratio of cocoa powder were determined. Two different types of chocolate were produced, control cocoa powder and low protein cocoa powder. Color, antioxidant activity, total phenolic content, DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil) free radical scavenging activity, iron ion reduction potential analyzes were applied to both chocolate samples. In addition, amino acid (AA) contents of chocolate samples were determined.

When the results of the analysis were evaluated, it was determined that the solubility of cocoa powder increased from 28.61% to 50.69%. The decrease in protein content of cocoa powder by isoelectric precipitation was determined best at pH:3.5. A 38.61% decrease in protein was detected at pH:3.5. It was observed that total phenolic substance, DPPH and FRAP values were higher in chocolate samples with low protein content compared to the control group chocolate ($P<0.05$). It was determined that the processes performed to reduce the protein ratio had a statistically significant effect on the color values of chocolate L^* , a^* and b^* . ($P<0.05$). Although soluble sugar was not detected with the HPLC-RID detector in the control sample, the amount of glucose and fructose was determined to be 23.33 g glucose and 3.55 g fructose in 100 g low protein cocoa powder. In the study, a total of 19 essential (EAA) and non-essential (NEAA) amino acids were identified. Phenylalanine content was determined as 162.80 ± 0.95 in mg/100 g control sample and 138.19 ± 2.11 in low protein chocolate samples, and it was determined that phenylalanine ratio decreased by 15.12% at the end of the study. In summary, evaluating the purpose of comprehensive food material for the consumption of these PKU patients to obtain products with limited protein content; new dark chocolate containing 38% more protein than standard dark chocolate samples was produced.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Kakao (*Theobroma cacao* L.), Malvaceae familyasına ait neotropik bir ağaçtır. Batı Afrika, Orta ve Güney Amerika, Batı Hint adaları ve Asya'nın tropikal bölgelerinde yetiştirilmektedir (Kongor ve ark., 2016). Araştırmalara göre, dünyada yılda 4651 bin ton kakao çekirdeği üretilmektedir (ICCO, 2019). Kakao üretimi, genellikle tropik ülkelerdeki çiftçiler için ana gelirlerden biridir ve çikolata yapmak için her hangi bir alternatif bitki veya sentetik ürün yoktur (Figuerola-Hernández ve ark., 2019; Utomo ve ark., 2016). Kakao çekirdekleri biyoaktif bileşiklerce oldukça zengindir ve bu bileşikler, ya doğal olarak meydana gelir veya teknolojik süreç sırasında sentezlenir. Kakao çekirdeklerinde bulunan polifenolik bileşikler, toplam bileşenlerin yaklaşık %12-18'sini oluşturur. Çekirdekde tespit edilen ana fitokimyasallar fenolik asit türevleri, flavonoidler, amino asit türevleri ve diğer polar bileşiklerdir (Cádiz-Gurrea ve ark., 2020). Bu fitokimyasalların antioksidan potansiyeli, tip 2 diyabetin önlenmesi, antimikrobiyal aktivite, kardiyovasküler hastalık riskinin azalması, kan basıncının düşürülmesi gibi sağlık üzerine birçok faydası vardır (Dugo ve ark., 2018; Ludovici ve ark., 2017; Oracz ve Nebesny, 2016; Ramos ve ark., 2017; Todoroviç ve ark., 2017). Günümüzde kakao çekirdekleri, çikolata, kakaolu içecekler, dondurma ve unlu mamuller gibi geniş bir ürün yelpazesinin ana bileşenleri olan çikolata likörü, kakao tozu ve kakao yağı elde etmek için işlenir (Beg ve., 2017; Afoakwa ve., 2008).

Kakao meyvesi toplandıktan sonra işlenme sürecinin her aşamasının çekirdeklerin özellikleri ve kalitesi üzerinde farklı bir etkisi vardır. Özellikle fermentasyon, kurutma ve kavurma aşamaları kakao çekirdeklerinin aroma gelişimi için oldukça önemlidir (Afoakwa, 2008; Owusu M., 2011). Fermentasyon aşamasında kakao çekirdekleri çeşitli mayalar, laktik ve asetik asit bakterileri tarafından fermente edilir ve ardından güneşte veya yapay olarak kurutulur (De Vuyst ve Weckx, 2016). Krutmanın temel amacı, çekirdeklerin nem içeriğinin ağırlıkça %7-8'in altına indirmek ve ayrıca

fermantasyon sırasında başlatılan oksidatif aşamaların devamına katkıda bulunmaktadır (Hansen ve ark., 1998; Misnawi ve ark., 2002). Bir sonraki aşama olan kavurma, kakao çekirdeği işleme sürecinde, kakao türevi ürünlerinin kalitesini etkileyen temel teknolojik işlemlerdendir. Bu süreç, çikolatanın karakteristik aromasının oluşumunda önemlidir. Kavurma prosesi kahve rengin yoğunluğunu daha da artırır ve çekirdeklerin dokusunda bir sıra değişikliklere neden olur (Olivierove ark., 2009). Öğütme aşamasında ise yüksek yağ içeriğinde dolayı çekirdekler kakao likörü olarak isimlendirilen oldukça viskoz bir yapıya dönüşür. Kakao likörünün preslenmesiyle de, kakao tozu ve kakao yağı elde edilir (Kongor ve ark., 2016). Kakao likörü macunsu kıvamdadır ve yaklaşık % 55 kakao yağı (Theobroma yağı) ve % 45 kakao keki içerir (Health, 2020). Çikolata çeşidine bağlı olarak son ürünlerdeki kakao likörünün oranı, çikolatanın ne kadar koyu olacağını gösterir. Mesela, bitter çikolatada kakao likörü oranı %70–85, yarı tatlı veya acı tatlı çikolatada %35, beyaz çikolatada %20 ve sütlü çikolatada %10–12, kakao likörünün kısmen kakao yağından arındırılmasıyla elde edilen kakao tozunda ise, sadece %22 kakao likörü vardır (Callebaut, 2017).

Kakao çekirdeğinin öne çıkan diğer kalite faktörlerinden biri de yağ içeriğidir (Fowler, 2008). Kakao yağı, yağ miktarı %40 ile %50 arasında değişen kakao çekirdeklerinde bulunan bitkisel bir yağdır. Özellikle çikolata ve diğer şekerleme endüstrisi ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Peláez ve ark., 2016).

Çikolata, kakao çekirdeklerinin şeker, kakao yağı, lesitin ve süt (çikolata türüne bağlı olarak) gibi bileşenlerin eklenerek işlenmesiyle elde edilen, popüler bir gıdadır (Kruszewski ve Obiedziński., 2018; Liu ve ark., 2015). Genel olarak bileşimlerdeki farklılıklara göre bitter, sütlü ve beyaz çikolata çeşitleri vardır (Awad ve Marangoni, 2006; Afoakwa ve ark., 2008; Beckett, 2010). Bitter çikolatanın formülasyonu esas olarak kakao likörü, şeker ve kakao yağından, sütlü çikolatanınki şeker, kakao yağı, süt kuru maddesi ve kakao liköründen oluşur. Beyaz çikolata ise şeker, kakao yağı ve süt kuru maddesini içerir. Ayrıca çikolata lesitin ve poligliserol polirisinoleat (PGPR) gibi emülgatörlerin yanı sıra tuz, tatlandırıcılar, meyveler veya baharatlar da içermektedir (Rousseau, 2007). Kullanılan malzemeler arasında meydana gelen farklı etkileşimleri güçlü bir şekilde belirleyen inceltme, konçlama ve temperleme

adımlarıdır. Çikolata üretiminde özellikle temperleme, renk, sertlik ve raf ömrü gibi ürünün son özelliklerini etkileyen önemli bir adımdır. Bu nedenle, bu adımla ilgili proses koşullarının kontrolü ürünün nihai kalitesi ve stabilitesi için oldukça önemlidir (Herrera ve Hartel, 2000; Toro-Vazquez ve ark., 2004; Altimiras ve ark., 2007; Pérez-Martínez ve ark., 2007; Debaste ve ark., 2008).

Günümüzde çikolata genellikle düşük besin değerine sahip bir gıda olarak görülse de, 17. yüzyılın ortalarından 20. yüzyıla kadar Avrupalılar kakaonun iyileştirici özellikleri olduğuna inanarak kullanıyorlardı. Çikolatanın karaciğeri rahatlattığına, sindirime yardımcı olduğuna, kişiyi mutlu ve güçlü kıldığına, ateş düşürdüğüne, böbrek rahatsızlıklarına, anemiyi, tüberkülozu, ve gutu tedavi ettiğine inanılıyordu (Coe ve Coe 2013). Günümüzde ise çikolatanın, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesindeki potansiyel rolü araştırmacıların ilgi odağı olmuş ve çikolatadaki kakaonun, nitrik oksit aktivasyonu, antioksidan etkisi (lipoprotein oksidasyonu ve ultraviyole kaynaklı DNA oksidasyonunun inhibe edilmesi), kan basıncı, HDL kolesterol ve kardiyovasküler risk faktörleri üzerinde yararlı etkileri olduğunu gösteren çalışmalar dikkati çekmektedir (Corti ve ark., 2009; Balzer ve ark., 2008; Grassi ve ark., 2008; Baba ve ark., 2007).

Yetişkinlere oranla çocuklar, çikolatayı daha sık tüketen yaş gruplarından ve zararlı madde içeriği yüksek gıdalara oranla, çikolata vücuda zararlı madde içeriği açısından en savunmasız gıda grubu olarak bilmektedir (Yanus ve ark., 2014). Ancak sağlıklı çocuklardan farklı olarak, özellikle fenilketonüri (PKU) gibi hastalığı olan çocukların beslenme durumunun doğru şekilde ayarlanması çok önemlidir (Argent ve ark., 2017; Madhok ve ark., 2006). Bu bağlamda, gen defekti nedeniyle enzim eksikliği veya yokluğunda gelişen hastalıklardan bazıları metabolize olmayan besin öğelerinin diyetten çıkarılması ya da miktarının kısıtlanması ile tedavi edilmektedir. Yenidoğan döneminden itibaren ortaya çıkan metabolik bozuklukların çoğu ise yaşam boyunca devam eden ağır hastalıklardır (Köksal ve ark., 2008).

Doğuştan gelen metabolik hastalıklardan biri olan, PKU, ilk olarak 1934'te Asbjorn Folling tarafından tanımlanan, otozomal resesif bozukluktur (Christ, 2003).

Hastalığa sebep olan etmenler, fenilalanin hidrosilaz enziminin veya BH4 kofaktörünün eksikliğidir. Fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliğine bağlı olarak fenilalanin (Phe) tirozine dönüşemez (bBlau ve ark., 2010). Böylelikle, Phe kanda ve beyinde birikir ve beyin disfonksiyonunun birincil nedeni olarak kabul edilir. Tedavi edilmediği takdirde, yüksek kan ve beyin Phe konsantrasyonlarında ciddi zihinsel engellilik, nöbetler, psikiyatrik ve motor problemlerine sebep olur. Bu nedenle tedavisi, diyet kısıtlaması yoluyla kan ve beyin Phe konsantrasyonlarının azaltılmasına dayanır (van Spronsen ve ark. 2021).

PKU yönetiminin temel bileşeni olan düşük Phe diyeti, yenidoğan taraması uygulanan bebeklerde genellikle yaşamın ilk 2 haftasında başlatılır. Diyet yönetimini, Phe içermeyen L-amino asitlerle takviyeleri ve buna ek olarak, et, balık, yumurta, peynir, kuruyemiş, tohum ve bakliyat gibi yüksek proteinli gıdaların ciddi şekilde kısıtlanması oluşturur. Protein içeriği yüksek gıdaların günlük beslenmeden tamamen çıkarılması veya kısıtlanması sebebiyle, çocukların enerji gereksinimlerini karşılamak için karbonhidratlı gıdalar, özellikle bitki ve tahıl nişastaları yüksek oranda kullanılır (Rosha ve ark., 2013; Rocha ve ark., 2012; Schulz ve ark., 1995). Büyüme ve gelişme aşamasındaki çocuklar için çoğu zaman, Phe uzaklaştırılmış, amino asitler açısından zengin tıbbi gıdalar (bunlar formüle edilmiş gıdalar veya protein ikameleri olarak adlandırılır) reçete edilir. Düşük fenilalaninli protein kaynağı olan glikomakropeptid, bazı tıbbi gıdalarda kullanılan diğer potansiyel amino asit kaynaklarından biridir (Ney ve ark., 2009). Tıbbi gıdalara ek olarak, ekmek, makarna ve fıstık ezmesi gibi gıdalarla diyeti desteklemek için düşük proteinli modifiye gıdalar ticari olarak mevcuttur ve bu gıdalar düşük proteinli olacak şekilde özel olarak modifiye edilmiştir (Rocha ve MacDonald, 2016). Ancak bu modifiye gıdalar normal gıdalarla karşılaştırıldığında çok pahalıdır (Rose ve ark., 2019).

Çocuklarda diyet tedavisinin başarılı olması, anne-babanın uygulanan diyet tedaviyi anlamalarına, motivasyonlarına, organizasyon yeteneklerine, yaşam biçimi değişikliğine uyum sağlayabilmelerine, disiplinli olmalarına ve düşük Phe diyetin kontrolünü yapabilmelerine bağlıdır (Channon ve ark., 2007).

Gelişmiş ülkelere oranla Türkiye'de akraba evliliklerinin ve doğum sayısının yüksek olması nedeniyle doğumsal metabolizma hastalıklarına daha sık rastlanmaktadır. Genelde 1:10000 sıklıkta görülen doğumsal metabolizma hastalıklarından biri olan PKU oranı, Türkiye'de 1:4500 oranında tespit edilmiştir (Demirkol 2002 ; Özalp ve ark., 2001). Türkiye'de fenilketonürlü hastalara yardım sağlamak amacıyla “Fenilketonürlü Çocukları Tarama ve Koruma Derneği” ile “Fenilketonürlü ve Diğer Kalıtsal Metabolik Hastalıklı Çocuklar Vakfı-METVAK” adlı sivil toplum örgütleri faaliyet göstermektedir. PKU çocukları tarama ve koruma derneği “Ulusal Fenilketonürlü Taraması”nın parasal giderlerini karşılamakla beraber, METVAK (Metabolik hastalıkların teşhisi ve tanımlanan vakaların tedavisi vakfı) sosyal güvencesi olmayan hastalara her zaman diyet tedavisi için destek vermektedir (Tokatlı, 2006).

Bu çalışmada, PKU' lu hastalar için, çikolata veya kakao ürünlerinin üretiminde kullanılabilecek kakao tozunun protein oranını azaltmak amaçlanmıştır. Bu bağlamda, Alkalaz, Amilaz ve Viskozim enzimleri kullanılarak kakao tozunun çözünürlüğü artırılmış, daha sonra izoelektrik çöktürme ile protein seviyesi düşürülmeye çalışılmıştır. Protein oranı düşürülmüş olan kakao tozu solisyonununa tekrar toz haline getirmek için püskürterek kurutma işlemi uygulanmış ve bu toza şeker, amino asit, antioksidan aktivite (DPPH, FRAP), toplam fenolik madde (TFM) analizleri uygulanmıştır. Daha sonra düşük proteinli kakao tozu kullanılarak çikolata üretilmiş ve üretilen çikolatada renk analizi yapılmıştır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kakao (*Theobroma cacao*)

Kakao çekirdekleri olarak adlandırılan *Theobroma cacao* (Malvaceae familyası) tohumları çikolata likörü, kakao kuru maddesi, kakao yağı ve çikolata yapımında kullanılan başlıca üründür (FAO, 2015). Amerika, Afrika, Asya ve Okyanusya'nın tropikal bölgelerinde yetişen kakao, yıllık küresel kakao çekirdeği üretiminin yaklaşık 4 milyon tonunu karşılamaktadır. Kakao ağacının, çapraz tozlaşma ile meyveye dönüşen çiçekleri vardır ve meyvelerinin görünümü farklı büyüklükte, şekil ve renktedir (Aikpokpodion, 2007). Kakao ağaçları, dünyanın tropikal bölgelerinde 10 milyon hektarın üzerinde bir alanda kakao üretimi için ekimi yapılmakta ve %83'ü Afrika'da, geri kalanı Asya / Okyanusya ve Amerika kıtasında yetiştirilmektedir (FAOSTAT, 2016). Fildişi Sahili, Gana, Endonezya, Ekvador ve Kamerun dünyadaki birincil kakao üreten ülkeler sırasındadır (FAO, 2015).

Kakao çekirdekleri ve kakao çekirdeği ürünleri *Theobroma cacao*'nun dört ana alt türünden, yani geleneksel Criollo (ince aromalı), Forastero (hafif acı aromalı), bunların doğal melezi Trinitario (ince aromalı) ve son olarak Nacional'dan (ince aromalı) üretilmektedir (Hii ve ark., 2009). Genel olarak kakao çeşitleri, coğrafi köken, çekirdek morfolojisi, meyve verimi, genotip, hastalık direnci ve lezzet özelliklerine göre farklılıklar göstermektedir. Forastero çeşidi dünya çapındaki toplam kakao üretiminin yaklaşık %95'ini ve ince aromalı çeşitler olarak kabul edilen Trinitario, Criollo ve Nacional ise toplam dünya kakao üretiminin %5'inden azını oluşturmaktadır (Rawel ve ark., 2019).

Forastero, Amazon bölgesine özgüdür ve büyük ölçüde Batı Afrika ve Güneydoğu Asya'da yetiştirilmektedir. Forastero çeşitleri hem ağaç, hem de meyve morfolojisinde

daha fazla değişkenliğe sahiptir. Meyve olgunlaşmaya başlayınca kabuk kısmı daha da sertleşir ve sarı renklidir. Meyve 30 ve daha fazla soluk, koyu mor renkli çekirdeklere sahip, kavun gibi yuvarlak bir şekildedir. Bu çeşit genellikle diğerlerinden daha kuvvetlidir ve şişmiş sürgün, benekli yaprak, sarı mozaik, kakao nekrozu, cadı süpürgesi, kara bakla gibi hastalıklara ve ayrıca zararlılara karşı daha az hassastır (Dzahini-Obiatey ve ark., 2010; Afoakwa 2010). Olgunlaşmış tipik Forastero kakao podları hafif acı, çok güçlü kakao tadına sahip koyu kahverengi kotiledonlarla karakterizedir. Bu çekirdeklerden üretilen çikolata, çikolata aroması bakımından zengindir ancak ağızda oluşturduğu meyvemsi aroma notaları zayıftır (DeZaan Cocoa Manual 2009; Hebbar ve ark. 2011).

Criollo düşük canlılık, düşük üretkenlik, hastalıklara, böceklerle ve stres atağına karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğu için daha az yetiştirilmektedir (Afoakwa 2010; Hebbar ve ark., 2011). Günümüzde sadece Venezuela, Orta Amerika, Madagaskar, Sri Lanka ve Samoa'daki eski plantasyonlarda bulunur (Fowler 2009). Yüksek kaliteli kakao çekirdeği olduğu için, daha az acı ve daha aromatiktir. Bu yüzden diğer çekirdeklere göre daha hafif ve daha besleyici bir kakao aromasına sahiptir, ancak mali değeri son derece yüksektir (Fowler 2009; DeZaan Cocoa Manual 2009; Rusconi ve Conti 2010). Criollo kakao plantasyonunun verimi, aynı büyüklükteki bir Forastero plantasyonunun veriminden oldukça düşüktür. Criollo çeşidinin meyveleri yumuşak ince bir kabuğa sahiptir ve meyveler az miktarda kırmızı pigmentasyonlu beyaz veya soluk mor renkli 20-30 çekirdek içermektedir. Criollo baklaları olgunlaştığında uzun, sarı veya kırmızıdır, derin ve büyük olukları ile dikkat çeker (Afoakwa, 2014).

Trinitario kakao çeşidi, Criollo ve Forastero çeşitlerinin melezdır. Trinitario, ilk olarak Trinidad'da geliştirilmiş (Willson 1999; DeZaan 2009), adı da buna uygun olarak verilmiştir. Ancak daha sonra Venezuela, Ekvador, Kamerun, Samoa, Sri Lanka, Java, Papua ve Yeni Gine gibi bölgelere de yayılmıştır (ICCO 2012). Bu çeşit, Criollo'dan çok daha yüksek kalitededir, Forastero'dan ise daha yüksek verim ve hastalıklara karşı daha yüksek direnç göstermektedir (Mossu 1992; Afoakwa 2010). Tipik Trinitario kakao podlarının rengi değişkendir, podlar uzun veya kısa, değişken renkte, otuz bazen

daha fazla çekirdek içerir. Beyaz renkli çekirdekler ise nadiren görülmektedir (Afoakwa, 2014).

Nacional çeşidi yalnızca Ekvador'da yetiştirilir ve belirgin çiçeksi, baharatlı tat notalarına sahip Arriba çekirdeklerini oluşturur (Aprotosoie ve ark., 2016). Çok az yetiştirilmektedir. Günümüzde, saf Nacional kakao çeşitleri çok nadir bulunmaktadır (Fowler 2009).

2.1.1. Kakao çekirdeğinin üretimi

Kakao çekirdeklerinin ön işleme genellikle menşe ülkerde gerçekleşir ve bu da kalite, lezzet profili üzerinde önemli bir yere sahiptir. Çifçiler kakao podlarını hasat etmek, meyvenin kesilip çekirdeklerin çıkarmak, fermente etmek ve kurutmaktan sorumludurlar. Bu işlemler sırasında kako çekirdeğinde bir dizi biyokimyasal reaksiyon gerçekleşir (Beckett ve ark., 2017). Kakao çekirdeğinin aroması genotipe (Qin ve ark., 2017), coğrafi kökene (Marseglia ve ark., 2020) ve hasat sonrası işleme (fermantasyon, kurutma ve kavurma) bağlıdır (Frauendorfer ve Schieberle, 2008; Mota-Gutierrez ve ark., 2018; Rodriguez-Campos ve ark., 2011).

Kakao genellikle 4 ila 8 metre boyunda küçük bir ağaçtır, ancak büyük orman ağaçları tarafından gölgelendiğinde uzunluğu 10 metreye kadar ulaşabilir. Kakao meyvesi kavun görünümünde ve 15-25 cm uzunluğundadır. Olgun bir meyve kalın bir müsilaçlı hamur içine gömülmüş 30 ila 50 çekirdek (todum) içeren nispeten kalın bir kabuktan oluşur (Afoakwa, 2014).

Belirli bir zaman diliminde kakao meyvelerinin hasat edilmesi kararı genellikle çiftçilerin deneyimlerine dayanmaktadır (Dand, 2010). Hasattan sonra, meyveler tarlada açılır veya kırılır, çekirdekler onları kaplayan pulp ile birlikte dışarıya çıkarılarak yığınlar halinde istiflenir (Rojo-Poveda ve ark., 2020). Kakao çekirdekleri bir embriyo, iki kotiledon (tohum kuru ağırlığının %86-90'ı) ve tohumları çevreleyen müsilaçlı pulptan (kuru ağırlığın yaklaşık %10-14'ünü oluşturur) oluşur (Rawel ve ark., 2019; Santander ve ark., 2019). Ham kakao çekirdekleri büzücü, hoş olmayan bir tada

sahiptir, karakteristik kakao tadı ve aromasını elde etmek için mutlaka fermente edilmeleri ve kurutulmaları gerekir (Ho ve ark., 2014).

Kakao çekirdeği fermentasyonu ya geleneksel uygulamalar yoluyla kakao yığınlarının kutular, sepetler, tepsiler içinde, yada doğrudan fermentasyon ünitesi platformlarına toplanması ile gerçekleştirilen mikrobiyal süreçtir. Geleneksel işlem, kakao çekirdeklerinin kapsülden elle çıkarılmasıyla başlar. Daha sonra çekirdekler yığınlar halinde kutulara (ahşap veya plastik) veya tepsilere yerleştirilir. Son olarak muz yapraklarıyla kaplanır ve kakaonun kökenine, genotipine bağlı olarak 5-7 gün fermentasyona bırakılır (Guehi ve ark.,2010; Moreira ve ark., 2018).

Kakao pulpu, fermentasyon sırasında mikroorganizmalar için substrat görevi gören şekerlerden (glikoz, fruktoz ve sakaroz), sitrik asit ve pektinden oluşuyor. (Lefebvre ve ark., 2010). Fermentasyon özellikle mayalar, laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri nin baskın olduğu mikroorganizmaların etkisiyle aroma ve lezzet öncülerinin geliştirilmesine izin veren önemli bir adımdır (Janek ve ark., 2016 ; Voigt ve ark., 2018). Bu süreçte etanol, laktik ve asetik asitler gibi metabolitler üretilir. pH 7'den 4-4.5'e düşer ve sıcaklık 45 °C'ye kadar yükselir (Santander ve ark., 2019). Bu pH ve sıcaklık değişiklikleri, kakao çekirdeklerinde pulpun bozulması ve kotiledonun ölümüne (Sârbu ve Csutak, 2019) ayrıca alkoller, karboksilik asitler, aldehitler, ketonlar, esterler, pirazinler ve biyoaktif peptitler gibi aroma bileşiklerinin üretimini içeren bir dizi işleme neden olur (Aprotosoaie ve ark., 2016; Janek ve ark., 2016; Voigt ve ark., 2018; Marseglia ve ark.,2019).

Kakao çekirdeklerinin fermentasyonu sürecindeki mikroorganizmalar, genellikle, menşee ülkelerde bulunan çevreden kaynaklanır. Nadir durumlarda özel olarak tanımlanmış starter kültürler de kullanılmaktadır (Lefebvre ve ark., 2012). Başlangıçta maya ve laktik asit bakterileri laktik asit üreterek, çekirdekleri kaplayan kalın müsilaj hamurun içeriğindeki şekeri etanole dönüştürür, daha sonra kakao çekirdeği yığınlarının karıştırılması ile havalandırma başladığında, ortamdaki oksijenin artması, özellikle sıcaklığının mayaların çalışamayacağı derecelere ulaşmasıyla, asetik asit bakterileri etanolden asetik asit üretir. Her iki reaksiyon da oldukça ekzotermiktir ve

kakao kütlesinin sıcaklığını artmasına sebep olur (Afoakwa ve ark., 2012; Delgado-Ospina ve ark., 2020; Efraim ve ark., 2010). Ekzotermik mikrobiyal metabolizma nedeniyle kakao çekirdekleri yığınlarının sıcaklığı 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara yükselir, böylelikle çekirdeklerin rengi beyazdan mor veya kahverengiye dönerken ilk başta 7 olan pH 4 ile 4,5 arasına düşer (John ve ark., 2016). Kakao çekirdeklerinin fermantasyon sürecinde renk değişimleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kakao çekirdeklerinin fermantasyon sürecinde renk değişimleri (Brach ve ark., 2016).

Fermantasyon sırasında elde edilen düşük pH değerleri, depo proteinlerini (özellikle vicilin) serbest amino asitlere ve peptitlere hidrolize eden endojen proteolitik enzimleri, aspartik endoproteazı ve karboksipeptidazı aktive eder. Özellikle bu bileşikler, indirgen şekerlerle birlikte kurutma ve kavurma esnasında oluşan Maillard reaksiyonu için çok gereklidir (Adeyeye ve ark., 2010; Marseglia ve ark., 2014; Rohsius ve ark., 2006; Spizzirri ve ark., 2019). Birincil mikrobiyal fermantasyon ürünleri yani, etanol, laktik asit ve asetik asit, yaş kakao çekirdeklerine nüfuz ederek biyokimyasal reaksiyonlara neden olur ve böylece yaş çekirdeğin kimyasal bileşimini önemli ölçüde değiştirir. Böylelikle, yaş çekirdek içinde genel bir savunma reaksiyonu mikrobiyal kolonizasyon sırasında tetiklenir ve jasmonik asit türevleri gibi stres tepkisi faktörlerinin yanı sıra diğer antimikrobiyal savunma bileşikleri, en önemlisi de polifenoller serbest bırakılır (D'Souza ve ark., 2017; Fayeulle ve ark., 2019). Fermantasyon esnasında kakao çekirdeklerinin yükselen polifenol içeriği, taze tohumlarda %15-20 olan acı ve mayhoş tadın %5'e kadar azalmasına sebep olur (Afoakwa ve ark., 2008). Kakao aromasının öncüleri fermantasyon süreci sırasında gelişir. Bunlar kakaoya acılık veren metilksantinler ve hem renk, hem de burukluk veren flavonoidler gibi bileşenlerdir. Eğer çekirdekler fermantasyon olmadan

kurutulursa, o zaman sadece minimal bir çikolata tadına sahip ürünler oluşur. Endüstride bu tür çekirdekler de üretilir, ancak sadece kakao yağı üretimi için kullanılır (Fowler, 2009).

Fermentasyonun ardından kakao çekirdekleri kurutulur, tropik ülkelerden kakao ihraç eden ülkelere nakledilir (Payne ve ark., 2010). Kurutma, kakao çekirdeklerinin nem içeriğini azaltmak, kf oluşumunu önlemek, yüksek kaliteli ürün üretmek için gerekli lezzet ve rengin oluşumu ve biyokimyasal reaksiyonların kolaylaştırılması amacıyla fermentasyon işleminden hemen sonra yapılır (Watson ve ark., 2013). Fermantasyondan sonra, yaklaşık %60 olan nem içeriği, kurutma yoluyla %7,0-7,5'e kadar iner. Kurutma işlemi, güneşte kurutma ve yapay kurutma olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. Yaygın olarak bilinen kakao çekirdeklerinin güneşte veya seralarda kurutulması 7-14 gün sürer. Güneşte kurutma işlemi, kakao çekirdeklerini kurutmanın, kalite için önerilen en iyi ve en ucuz yoludur. Kakao çekirdekleri ifiler tarafından güneşte kurutma için özel yapılmış temiz hasır, ahşap ve beton zeminlerin üzerine yayılır (Dina ve ark.,2013). Daha iyi kurutma sağlamak için çekirdekler manuel olarak döndürülür veya tırmıklanır, hava değişiklikleri olduğunda, yani yağmur yağdığında ise kurutma işlemine her zamankinden daha çok zen gösterilir (Hii ve ark., 2009). Eğer çekirdekler uzun süre kurutulma işlemine tabii tutulursa (7 günden fazla), küflenme sonucu mikotoksin oluşur. Yağmur mevsimi boyunca, yeterli güneş işığı olmaması, genellikle uzun süreli kuruma ile sonuçlanır (7 günün ötesinde). Bu ise kf istilasına ve mikotoksin oluşması ile sonuçlanır (Afoakwa, 2014). Diğer bir kurutma seçeneği olan yapay kurutmada ise 2–3 gün süren sıcak hava kurutucuları kullanılır. Bu da, asetik asidin daha az ortamdan uzaklaştırılmasına ve kakao çekirdeklerinde daha yüksek acılığa neden olur (Araujo ve ark., 2014). Yapay kurutucuların çoğu, havanın konveksiyon akımının, çekirdekleri kirletecek duman veya diğer kirletici maddelere izin vermeden akmasına olanak veren hava girişleriyle donatılmış kurutuculardır (Dina ve ark., 2013). Genellikle bu aşamadan sonra çekirdekler torbalanır ve daha sonraki işlemler için fabrikalara ihraç edilir. Kakao çekirdekleri, kurutmanın ardından sadece bir kez kullanılan jt çuvallara doldurulur (Afoakwa, 2014).

Fabrikada kakao çekirdeklerinin işlenmesinin ilk aşaması, yabancı maddelerin (taşlar, tahta, metal parçaları vb.) elenmesi ve güçlü mıknatıslarla uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem, kırma ve savurma ile yapılır. Kabuklar, genellikle bir tür çekiçle kırıldıktan sonra, kırılan kabuk ve kakao nib parçaları bir dizi elekten geçirilerek ayrılır. Daha sonra kakao çekirdekleri sterilizasyon işlemine tabii tutulur. Sterilizasyon, kakao çekirdeklerini veya niblerini, çekirdeklerdeki tüm mikroorganizmaları yok etmek için, uzun süre boyunca yeterince yüksek sıcaklıklara maruz bırakma tekniğidir. Bu işlemin amacı, hasat sonrası fermentasyon, kurutma, torbalanma ve nakliye sırasında kakao çekirdeklerine bulaşmış olabilecek mikroorganizmaları ortadan kaldırarak buharla ısıtma veya ısıtma yoluyla toplu yada sürekli bir temizleme yapmaktır (Afoakwa, 2014). Alkalizasyon işlemi (eğer yapılacaksa) bu aşamadan sonra gerçekleştirilir. Alkalizasyon, çikolatada alkalize kakao likörü kullanılmasına rağmen, esas olarak kakao tozu için uygulanan bir işlemdir. Kakao nibleri alkali bir çözelti ile örneğin, sulu bir potasyum karbonat yada sodyum karbonat gibi çözeltiler kullanılarak yapılır ve bu işlemin ana amacı kakao tozunun rengini değiştirerek daha koyu veya daha kırmızımsı-kahverengi yapmaktır (Afoakwa, 2014).

Kavrulma işlemi yapılmış kakao çekirdeklerinin kabukları daha kolay ayrılır, niblerinin alkalizasyondan sonra kavrulması ise daha iyi bir kakao tozu elde edilmesini sağlar (Codex Alimentarius, 2003). Kabukları ayrılmış, parçalanmış kotiledon, 15 dakika ila 2 saat süreyle 90 ° C ila 200 ° C arasında değişen süre ve sıcaklıklarda kavrulur, bu da Maillard reaksiyonunun oluşmasına, nem kaybına, başta asetik asit olmak üzere uçucu asitlerin azalmasına sebep olur (Beckett ve ark., 2017). Kavrurma, arzu edilen lezzetin oluşmasında önemlidir (Djikeng ve ark., 2018). Kakao niblerinin kavrulma süresi, kakao podlarının olgunlaşma sürecine, kakao çekirdeklerinin ve niblerinin nemine, işleme ekipmanına ve son ürünün arzu edilen aromasına bağlıdır (Schwan ve Wheals, 2004). Kakao çekirdekleri işleme endüstrisinde üç ana kavrurma yöntemi kullanılır ve bunlar aşağıdakileri içerir: (Afoakwa, 2014).

- 1 Tam kakao çekirdeklerini kavrurma
- 2 Kakao niblerini kavrurma
- 3 Likör kavrurma

Tam kakao çekirdeklerinin kavrulması işlemi kakao çekirdeklerinin metal plakalara yüksek hızlı çarpması ile kırılan kabukların çıkarılmasını kolaylaştırmak için, kırma ve savurmadan önce yapılan kavurma işlemidir. Bu işlem sırasında, ısı yağın bir kısmının kabuklara göç etmesine neden olarak, bir miktar kakao yağı kaybına sebep olur. Bu, özellikle kırık veya ezilmiş kakao çekirdeklerin de daha belirgin görülür.

Kakao niblerinin kavurma işlemi kavurmadan önce kabukların çıkarılması ile başlar ve bu sayede kakao çekirdeklerinin kavrulması sırasında oluşan zorlukların bir çoğunun üstesinden gelmeye yardım eder. Bu işlem ayrıca, belirli kakao türlerinde lezzet gelişimini iyileştirmek için, kavurma sırasında kakao niblerine alkali veya şeker çözeltisiyle işlenmesine yardımcı olur (Afoakwa, 2014).

Likör kavurmada ise, genellikle harmanlamadan önce kakao çekirdeklerine ısıl işlem uygulanır, yani kakao nibleri kavurmadan önce öğütülerek liköre çevrilir (Afoakwa, 2014).

Hem nib, hem de likör kavurmanın en büyük dezavantajı, kabuğun nibden gevşetilmeden çıkarılmasıdır ve bu, özellikle bazı kakao türlerinde kötü ayrılmaya sebep olur. Bu sorunu çözmek amacıyla, çekirdekleri termal olarak ön işleme tabi tutmak için çeşitli makineler geliştirilmiştir. Bu makineler çekirdek yüzeyinde yüksek sıcaklık oluşturarak ve iç nemi buharlaştırır, bu da çekirdeğin içinde bir basınç meydana getirmek suretiyle kabuğun nibden uzaklaşmasına neden olur (Afoakwa, 2014). Kakao çekirdekleri, çikolata, kakaolu içecekler, dondurma ve unlu mamuller gibi geniş bir ürün yelpazesinin ana bileşenleri olan çikolata likörü, kakao tozu ve kakao yağı elde etmek için işlenir (Beg ve ark., 2017; Afoakwa ve ark., 2008).

Kavurma işleminden sonra kakao nibleri öğütme aşamasından geçilir. Nibleri öğütterek liköre dönüştürmek için birçok makine kullanılır ve bunlar arasında taş değirmenler, diskli değirmenler, çekiçli değirmenler ve boncuklu veya bilyalı değirmenler bulunur. Öğütme işlemi birden fazla basamağı kapsar ve öğütme sırasındaki ısıl işlem niblerin içeriğindeki kakao yağının erimesini sağlayarak kakao likörünü oluşturur. Kakao nibi, içinde katı halde yaklaşık %55 kakao yağı içeren hücresel bir yapıya sahiptir. Niblerin

öğütülmesi ile kakao yağı 30 µm partikül boyutuna sahip kakao likörünü oluşturur, özellikle kakao tozu üretimi için ince öğütme çok önemlidir. Kakao likörün viskozitesi, öğütmeden önceki kavurma derecesine ve kakao niblerinin nem içeriği ile ilgilidir. Kullanılmayan likörlerin bayatlamasını ve mikrobiyal gelişmeyi önlemek için yaklaşık 90-100°C' lik bir sıcaklıkta depolama tanklarında ısıtılır, ardından likör satışı için paketlenir (Awua 2002).

2.2. Kakao Ürünlerinin Üretimi

2.2.1. Kakao tozu ve kako yağı

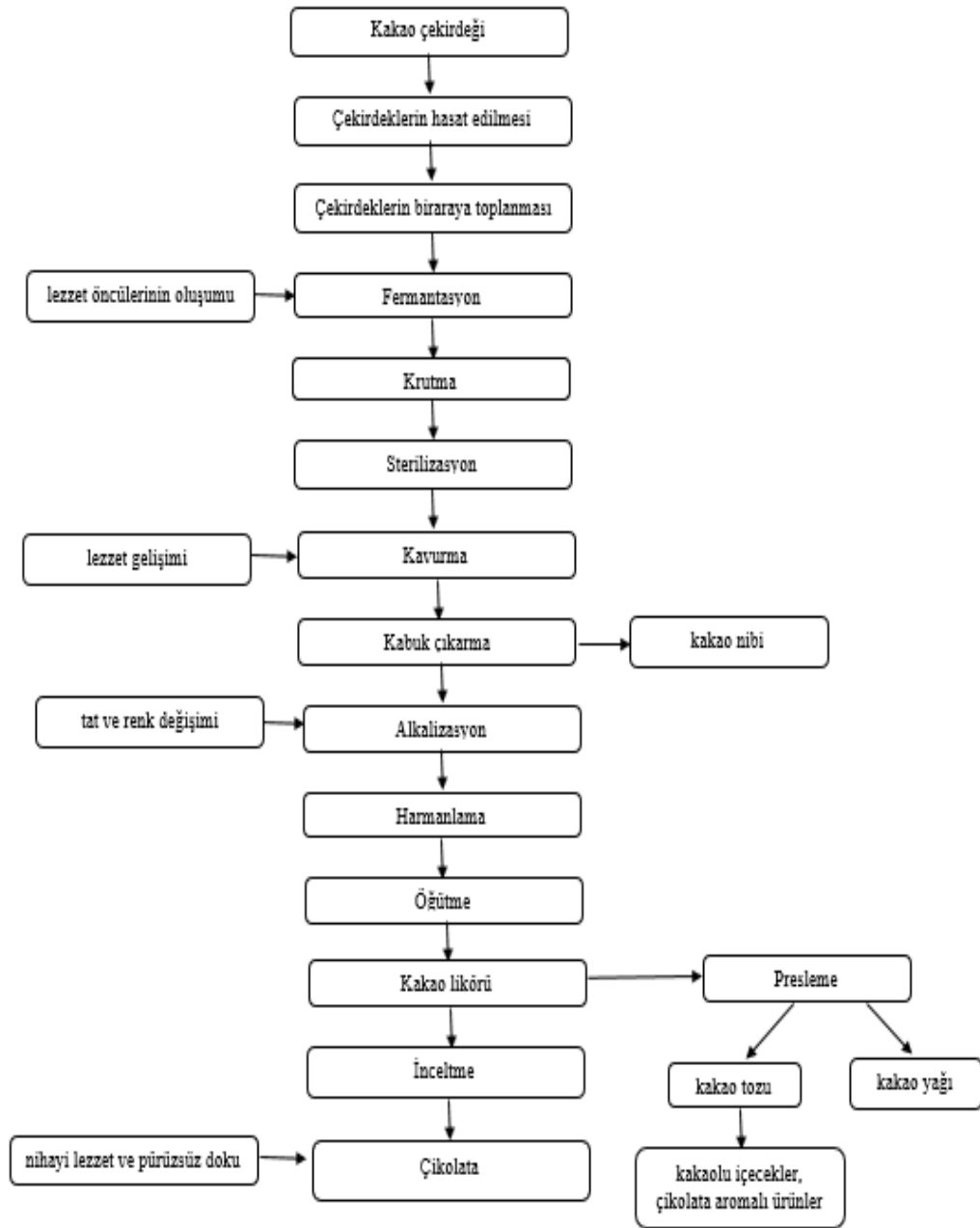
Kakao likörü, *Theobroma cacao*'nun fermente edilmiş, kurutulmuş, kavrulmuş ve öğütülmüş tohumlarından elde edilen üründür (Beckett, 2009). Kakao liköründen kakao yağı, presleme yoluyla (hidrolik, mekanik veya tercihen yatay olarak çalışan, 400-500 bar basınçta ve 90-100°C sıcaklıkta çalışan ekspeller pres vasıtasıyla) çıkarılır ve geride kakao keki adı verilen katı bir kütle bırakılır. Çıkarılan kakao yağı, çikolata üretim sürecinde kullanılmaktadır (Afoakwa ve ark., 2007; Żyżelewicz ve ark., 2014). Kakao liköründen presleme ile elde edilen kakao yağı, kakao niblerinin ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturur. Kakao likörünün presleme süresine ve presin ayarlarına bağlı olarak, elde edilen kekin yağ içeriği %10 ila %24 arasında olabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda, presleme işlemine bağlı olarak iki çeşit kakao keki elde edilir:

1. Preslenmiş kekte %22-24 arasında yağ içeren yüksek yağlı kek.
2. Preslenmiş kekte %10-12 arasında yağ içeren düşük yağlı kek.

Preslemeden sonra, çıkan kekler işlenmek için oldukça büyüktür ve bu nedenle ufalanmış kek olarak bilinen daha küçük parçalara ayrılmak üzere ufalama makinelerine gönderilir. Elde edilen ufalanmış kek, yağ içeriği ve alkalileşme derecesine göre depolanır ve arzu edilen tipte kakao tozu elde etmek için toz haline getirilmeden önce harmanlanır. Öğütme hatları, kakao keki parçacıklarını kakao tozunun tanımlanmış incelik düzeyine yani toz haline getiren çekiçli ve diskli veya pimli değirmenlerden elde edilir. Kakao tozu daha ince boyutlu toz haline getirildikten

sonra soğutulur, böylece kakao tozunun yağı stabil formda kristalleşir. Bu ise ambalajlamadan sonra torbalarda herhangi bir renk bozulmasını ve topakların oluşmasını önler. Daha sonra kakao tozu polietilen ile kaplanmış dökme kaplarda veya dört katlı kağıt torbalarda ambalajlanmadan önce elekler ve mıknatıslı sistemlerden geçirilir (Afoakwa, 2014).

Kakao yağı açık sarı renklidir, 26.7°C'nin altındaki sıcaklıklarda katı, ancak vücut sıcaklığında veya 35°C'de tamamen erir özelliktedir (Minifie 1989; Kaphueakngam ve ark., 2009). Çikolatanın oda sıcaklığındaki sertliği, parlaklığı ve ağza yerleştirildiğinde hızlı ve tam erimesi gibi özellikleri kakao yağından kaynaklanmaktadır (Saldaña ve ark., 2002). Kakao yağının miktarı, erime noktası ve sertlik gibi özellikleri kakao çeşidine, çevre şartlarına bağlıdır (ICCO 2012). Kakao yağı yaklaşık %95 triaçilgliserol, %2 diasilgliserol, %1'den az monoaçilgliserol, %1 polar lipid ve %1 serbest yağ asidi içerir (Biehl ve Ziegleder 2003). İklim, özellikle ortam sıcaklığı ve ısıdan kaynaklanan stres triaçilgliserollerin nihai bileşimini, kakao yağının erime ve kristalleşme özelliklerini etkiler (Biehl ve Ziegleder 2003; Chaiseri ve Dimick 1989). Düşük sıcaklıkta yetiştirilen kakao meyvelerinden elde edilen kakao yağı yumuşaktır ve yüksek doymamış triaçilgliseroller (Lehrian ve Keeney 1980) ve yüksek doymamış yağ asitleri, yani oleik ve linoleik asit içerir (Berbert 1976; Chaiseri ve Dimick 1989). Örneğin, yağış miktarı triaçilgliserol bileşimi üzerinde etkiye sahiptir. Meyve verme çağında yeterli yağış, serbest yağ asitlerinin yanı sıra triaçilgliserolde yüksek konsantrasyonlarda stearik asit ve oleik asit oluşmasına neden olur (Fowler 1999). Güneş ışığı, palmitik asit içeriğinin (Fowler 1999) ve kakao yağının iyot değerinin (Berbert 1976) artmasına sebep olur. Genel olarak, kakao ağacının yetiştirildiği alan ekvatora ne kadar yakınsa, yağın erime özelliği o kadar zorlaşır. Bu ise Malezya kakao yağının nispeten sert olduğu, buna karşın Brezilya kakao yağının ona kıyasla çok daha yumuşak olduğu anlamına gelir. Batı Afrika ülkelerinden biri olan Gana'da yetiştirilen kakao çekirdeklerinden elde edilen kakao yağının kıvamı Brezilya ve Malezya kakao yağı arasında sertli sahip olduğu yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Beckett, 2008). Şekil 2.2.'de kakao tozu, kakao yağı ve çikolata oluşumunun akış şeması gösterilmiştir.



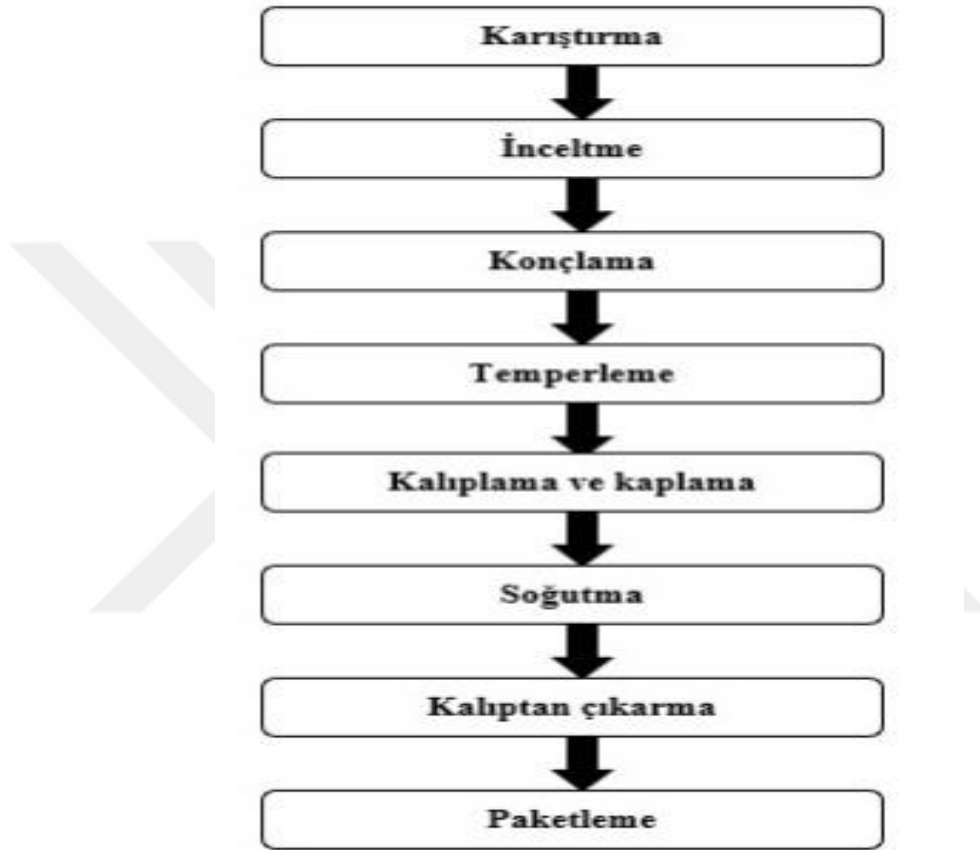
Şekil 2.2. Kakao çekirdeklerinin işlenmesi sonucu kakao liköründen kaka tozu, kakao yağı ve çikolatanın oluşması (Aprotosoie ve ark., 2016).

2.2.2. Çikolata ve çikolatanın üretimi

Geleneksel olarak kakao likörü, kakao yağı ve şekerin karıştırılması, inceltilmesi, yoğurulmasıyla hazırlanan çikolata, ana bileşeni kakao olan, benzersiz tadı ve ağızda eriyen özelliklere sahip yoğun bir katı parçacık süspansiyonudur (Beckett, 2009).

Çikolatanın duyu kalitesi, ağızdaki erime profilinin yanı sıra kendine özgü koku ve tatı (aroma özellikleri) ile ilgilidir (Braga ve ark., 2018).

Çikolata üretimi Şekil 2.3.'de özetlenen bir dizi aşamaları:



Şekil 2.3. Çikolatanın üretim aşamaları (Afoakwa, 2014).

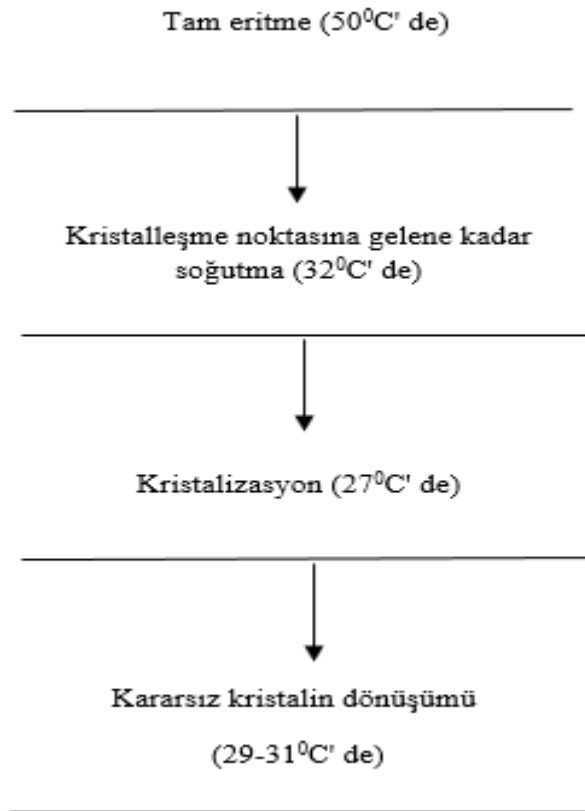
Çikolata üretiminde bileşenlerin karıştırılması, sabit formülasyon tutarlılığını elde etmek için sürekli veya kesikli bir karıştırıcıda zaman-sıcaklık kombinasyonları kullanılarak uygulanan temel bir prosestir. Kesikli karıştırmada, kakao likörü, şeker, kakao yağı, süt yağı ve süt tozu (ürün kategorisine bağlı olarak) içeren çikolata, 45–50°C'de 12 ila 15 dakika içinde iyice karıştırılır. Sürekli karıştırmada ise, genellikle Nestle ve Cadbury gibi büyük çikolata üreticileri tarafından kullanılan otomatik

yoğurucular vasıtasıyla biraz sert bir doku ve plastik kıvam elde edilir (Afoakwa, 2014).

Karıştırılan çikolatanın inceltme prosesi, modern çikolata şekerlemelerinde istenilen pürüzsüz dokunun oluşması için oldukça önemlidir. İnceltme, çikolatanın parçacık boyutunu azaltmak yani, parçacık boyutunun 25 mikronun altına düşürülmesi işlemidir (Afoakwa, 2014). Çünkü 25 mikronundan daha büyük parçacıklar tüketim zamanı dil üzerinde pütürlülük olarak algılanır ve çikolatanın duyuşal, reolojik niteliklerini önemli bir biçimde etkiler. Endüstriyel olarak, genellikle beş silindirli bir inceltici kullanılır. Her silindir bir öncekinden daha hızlı hareket eder ve çok ince bir çikolata filminin bir silindirden diğerine aktarılmasını sağlar (Beckett, 2009).

Konçlama, istenmeyen uçucuları ortadan kaldırdığı, nem içeriğini azalttığı ve böylece son ürünün lezzetini arttırdığı için son derece önemlidir (Afoakwa, 2011; Aprotosoie ve diğerleri, 2016). Konçlama geleneksel olarak üç aşamadan oluşur. İlk aşamada silindir makinelerde lapa şeklinde olan çikolata karışımı, istenmeyen uçucularının ve nemin uzaklaştırılabilmesi için, silindir makinelerden demleme makinelerine aktarılır. Bu aşamada ilave edilen yağ miktarın çikolatanın toz halinde hareket etmesine izin verecek kadar düşük, toz partiküllerin üzerini kaplamasına izin verilicek kadar yüksek olması gerekir. Parçacıkların yağ ile daha iyi kaplandığı ikinci aşamada, çikolata daha çok macunsu, daha az toz haline getirilir. Bu aşama oldukça önemlidir, çünkü tüm parçacıkların, çikolatanın nihai viskozitesini tanımlamada önemli bir faktör olan yağla kaplanması sağlanmalıdır. Kalan yağ ve emülgatör, konçlamanın üçüncü aşaması olan sıvı aşamasına kadar eklenmez. Bunun nedeni, bu ilavelerin her ikisinin de kakao macununun kıvamını katı halden akışkan hale değiştirmesidir. Emülgatör olarak lesitin kullanılıyorsa, çikolatada kalan nemi kendine çektiği ve nemin dışarı çıkmasını engellediği için çok çabuk eklenilmemesi özellikle önemlidir. Çünkü çikolatadaki fazla nem viskoziteyi artırır. Konçlamanın son aşaması sırasında eklenen yağ miktarı, emülgatörün tipi ve miktarı, hem üretilen çikolatanın çeşidine, hem de kalıplama veya kaplamada ne şekilde kullanılıp, kullanılacağına bağlıdır (Talbot, 2012).

Konçlamadan sonra uygulanan temperleme prosesi, çikolatanın yağ fazının polimorfizm yapısından dolayı gereklidir (Talbot, 2012). Kakao yağı, başlıca γ (I) α (II), β_2 (III) β_1 (IV), β_2 (V) ve β_1 (VI) üzere altı forma sahiptir. Form V, genel olarak iyi tavllanmış çikolatada en çok arzu edilen form olup, parlak bir görünüm, iyi kırılma, ağızda bıraktığı buruk çikolata tadı ve çikolata yağ çiçeklenmesine karşı en iyi direnci gösterir (Beckett, 2000). Çikolata kötü temperlenmişse, Form V, hızla Form IV'e dönüşür. Bu ise düzensiz kristal büyümesi nedeniyle rengi etkiler (Hartel 2001). Kakao yağında Form V ve VI en stabil formlardır. Form VI'nın üretilmesi zordur, ancak sertleştirilmiş çikolatanın yağ çiçeklenmesi ile birlikte uzun süre saklanmasıyla elde edilir (Beckett, 2008). Temperleme makineleri geliştirilmeden önce, çikolata elle temperlenirdi ve bu yöntem hala nispeten butik üretim yapan çikolatacılar tarafından kullanılmaktadır. Temperlemenin temel adımları Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Çikolata temperlemenin temel aşamaları (Afoakwa, 2014).

Farklı formlar farklı erime aralıklarına sahip olduğundan, temperlemenin püf noktası, erimiş çikolatanın sıcaklığını dikkatli bir şekilde kontrol etmektir (Stapley ve ark.,

1999). Çikolata temperlendiğinde ilk önce eritilir, sonra erimiş halinden yani 50°C'den , 30°C'nin biraz üzerine kadar soğutulur. Bu sıcaklıkta çikolata tamamen sıvı haldedir. Çikolata daha sonra V formundaki kristallerin çekirdeklenmesini başlatmak için soğutulur. Bu aşamada çikolata sıvı halinden soğutulduğunda hem kararlı, hem de kararsız formlar kristalleşir. Son olarak daha düşük erime noktalı formların kristallerini eritmek için birkaç derece hafifçe tekrar ısıtılır (Jovanovic ve ark., 1995). Endüstriyel olarak temperleme, çikolatayı kademeli olarak soğutmak ve daha sonra yeniden ısıtarak bir dizi eşanjörden geçirme işlemidir. İyi temperlenmiş bir çikolata iyi şekil, renk, parlaklık, kalıptan rahat çıkma, daha iyi ağırlık kontrolü, dengeli ürün, daha sert, ısıya daha dayanıklı (paketlenme sırasında daha az parmak izi) ve daha uzun raf ömrü gibi özelliklere sahiptir (Talbot, 2012).

Temperleyici, seçilen kalıp tipine bağlı olarak çikolatanın 20 g, 50 g ve 100 g'lık kalıplara dökülerek kalıplanması ve kalıptan çıkarılması için tavlama işlemi yapılmış karışımı otomatik bir sisteme gönderir. Depozitör, erimiş çikolatayı çikolata ile aynı sıcaklıktaki kalıplara otomatik olarak doldurmaya başlar. Eğer kalıplar çok sıcaksa, ürünün kalıplara yapışmasına, zayıf parlaklık ve çiçeklenmeye neden olur. Kalıplar çok soğuksa, zayıf parlaklık ve son ürünlerdeki hava kabarcıklarının sayısında artışa neden olur. Daha sonra vibratör, kalıplardaki sıvı çikolatayı özenle her kalıbı sallar (Talbot, 2012).

Kalıplama veya kaplama işleminden sonra ürünler, çikolatayı katılaştırmak için bir soğutma tüneline girer ve böylelikle soğutma işlemi başlar. Endüstriyel soğutma tünellerinin içinde farklı sıcaklıklara ayarlanmış birkaç aşama vardır. Soğutma işlemine ilk olarak yüksek sıcaklıkta başlamak önemlidir (tipik olarak 15–18°C). Bu da, daha fazla kristallerin oluşmasına sebep olur. Bu ilk yumuşak soğutmadan sonra, çikolata tüneline merkezinde 10–12°C sıcaklıklarla daha soğuk aşamalardan geçer. Bu soğutma kakao yağının büyük bir kısmını kristalleştirir ve katılaştırır. Son olarak, çikolata tünelden çıkarken sıcaklık tekrar yaklaşık 15°C'ye yükseltilir (Talbot, 2012). Soğutma işlemi bittikten sonra katılaşarak beklenen kıvamı alan çikolatlar kalıptan çıkarma makinelerine gider. Kalıptan çıkarma aslında tavlama ve soğutma işlemlerinin küçük bir parçasıdır, kaliteli ürünün temizliğinden sorumludur, çıkan boş kalıplar

döndürülür ve işlemin başına gönderilir. Ürünlerin kalıptan ayrılması, kalıpları büken bir mekanizma ve bir çekiçle sağlanır. Çikolatalar plastik tepsilerde onları taşıyan bir bant üzerinde kalıptan çıkarılır. Ardından bu plastik tepsiler arabalara toplanır ve yakındaki paketleme bölümlerine götürülür. Ürünlerin tepsilerde toplanması ile paketleme bölümlerine götürülmesi arasında geçen süre, ürünlerin yüzeyindeki fazla nemin kaybolduğu kuruma aşaması olarak bilinir (Afoakwa, 2014).

Paketleme tesislerinde çikolata tepsileri, çikolatayı makineye taşıyan bir taşıma bandına yerleştirilir. Paketleme makinesi çikolatanın gramına ve boyutuna bağlı olarak alüminyum folyoyu keser ve daha sonra kağıt ambalaj ile kaplar. Alüminyum folyo, kağıt ambalajdan önce çikolatayı ilk olarak sarar. Özellikle folyo, çikolatanın aromasını, soğuk sıcak değişikliklerinden koruyarak su buharı ve gaz geçişine karşı en iyi bariyeri sağlar. Kağıt malzeme ayrıca güçlü, kolay basılabilir ve az mali değere sahip olduğu için seçilmiştir. Makineler daha sonra çikolatayı parti numarasının yanı sıra üretim ve son kullanma tarihi ile etiketler. Kusursuz sarılmış çikolatalar, 18-20° C arasındaki sıcaklıklarda depo alanına gönderilmeden önce elle toplanır ve karton kutularda kolilenir (Afoakwa, 2014).

2.2.3. Çikolata

İçeriğindeki kakao kuru maddesi, süt yağı ve kakao yağı açısından farklılık gösteren çikolata tipleri (bitter, sütlü ve beyaz çikolata) vardır, bu nedenle nihai ürünler farklı karbonhidrat, yağ ve protein içeriğine sahiptir (Bakker ve ark., 2008; Lenfat ve ark., 2013). Genel olarak, sade çikolata süt yağı ve yağsız süt kuru maddesi içermezken, beyaz çikolata yağsız kakao kuru maddesi içermez. Çikolatanın ana bileşenleri kakao yağı, kakao kütlesi, kakao likörü, kakao tozu, süt yağı, süt tozu ve şekerdir. AB Çikolata Direktifi (Avrupa Birliği, 2000), bu bileşen grubu “asil bileşenler” olarak adlandırır. Bu asil bileşenlere ek olarak, çikolata, kakao olmayan bitkisel yağlar (izin verildiği yerlerde), emülgatörler ve diğer yenebilir maddeleri (izin verildiğinde) içerebilmektedir. Diğer yenebilir maddelere örnek olarak fındık, peynir altı suyu tozu, vanilya veya etil vanilin, tuz vb. gösterilir. Çikolatada kullanılan emülgatörler genellikle çikolata mevzuatında da tanımlanmıştır. En yaygın kullanılanları soya

lesitini, amonyum fosfatid (kolza tohumu yağı ve gliserolden üretilen sentetik bir lesitin türü) ve PGPR'dır. Lesitin, çikolatada en yaygın kullanılan emülgatördür, amonyum fosfatid ise bazı üreticiler tarafından tercih edilmektedir. PGPR, çikolatanın verim değeri üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir ve bu nedenle, çikolatada belirli akış özelliklerinin gerekli olduğu yerlerde (çoğu zaman lesitin ile kombinasyon halinde) kullanılır. Bu bileşenlerin farklı kombinasyonlarla birlikte kullanılması farklı türde çikolatalar üretilmesine yardımcı olur (Talbot, 2012).

Bitter çikolata, yüksek kakao içeriği sebebiyle, kateşin, epikateşin ve prosiyanidin içerikleri ile ilişkili olarak en yüksek polifenol değerine sahip kakaodan türetilen ürün olarak kabul edilir (Toker ve ark., 2018). Bitter çikolata (koyu çikolata, acı tatlı çikolata, siyah çikolata) bileşiminde en az %18 kakao yağı ve en az % 14 yağsız kakao kuru maddesi olacak şekilde, en az % 35 toplam kakao kuru maddesi içeren çikolatadır (TGKY-ÇÇÜT., 2003/23).

Granül veya pul bitter çikolata, bileşiminde en az %12 kakao yağı ve en az % 14 yağsız kakao kuru maddesi olacak şekilde, en az % 32 toplam kakao kuru maddesi içeren çikolatadır.

Kuvertur bitter çikolata, bileşiminde en az %31 kakao yağı ve en az % 2.5 yağsız kakao kuru maddesi olacak şekilde, en az % 35 toplam kakao kuru maddesi içeren çikolatadır.

Fındık ezmeli bitter çikolata, bileşiminde en az % 8 yağsız kakao kuru maddesi olacak şekilde en az %32 toplam kakao kuru maddesi içeren çikolataya % 20-40 arasında ince öğütülmüş fındık veya fındık füresi ilavesi ile elde edilen çikolatadır (TGKY-ÇÇÜT., 2003).

Sütlü çikolata, süt tozu, sıvı süt veya yoğunlaştırılmış süt şeklinde sütle yapılan katı çikolatadır. 1875'te İsviçreli şekerlemeci Daniel Peter, komşusu Henri Nestlé ile Vevey'de yoğunlaştırılmış süt kullanarak ilk sütlü çikolatayı oluşturdular (Shafi ve ark., 2018). Sütlü Çikolata, bileşiminde en az % 2.5 yağsız kakao kuru maddesi olacak

şekilde en az % 25 toplam kakao kuru maddesi içeren, ayrıca en az %14 süt kuru maddesi ve en az % 3.5 süt yağından oluşan, kakao yağı ve süt yağının toplam miktarı ise en az %25 olan çikolatadır.

Granül veya pul sütlü çikolata, bileşiminde en az % 20 toplam kakao kuru maddesi ve %12 süt kuru maddesi içeren, kakao yağı ve süt yağının toplam miktarı en az %12 olan çikolatadır.

Kuvertür sütlü çikolata, bileşiminde en az % 2.5 yağsız kakao kuru maddesi olacak şekilde en az % 25 toplam kakao kuru maddesi içeren, kakao yağı ve süt yağı toplam miktarı en az %31 olan çikolatadır.

Fındık ezmesi sütlü çikolata, bileşiminde en az % 10 oranında süt kuru maddesi içeren sütlü çikolataya, %15-40 arasında ince öğütülmüş fındık veya fındık fidesi ilavesi ile elde edilen çikolatadır.

Bol sütlü çikolata, bileşiminde en az % 20 toplam kakao kuru maddesi, en az %2.5 yağsız kakao kuru maddesi, az %20 süt kuru maddesi, en az %5 süt yağı içeren, kakao yağı ve süt yağının toplam miktarı en az %25 olan çikolatadır.

Kremalı çikolata, bileşiminde en az %5.5 süt yağı içeren sütlü çikolatadır.

Yağsız sütlü çikolata, bileşiminde en fazla %1 süt yağı içeren sütlü çikolatadır. Beyaz çikolata, bileşiminde en az %20 kakao yağı ve en az %14 süt kuru maddesi içeren ve en az %3.5'i süt yağı olan çikolatadır .

Dolgulu çikolata, dış kısmı toplam ürün ağırlığının en az % 25'ini içeren, bitter çikolata, sütlü çikolata, bol sütlü çikolata ve beyaz çikolatalardan birinden oluşan dolgulu çikolatadır (TGKY-ÇÇÜT., 2003/23). Tebliğimize esasen; dolgulu çikolata dolgu maddesinin ve çikolata tipinin adı ile adlandırılır (Tokuşoğlu, 2015).

Pralin, toplam ürün ağırlığının en az % 25 i bitter çikolata, sütlü çikolata, bol sütlü çikolata, beyaz çikolataların kombinasyonundan, karışımından veya herhangi birinden yada dolgulu çikolatadan oluşan bir lokma büyüklüğündeki çikolatadır (TGKY-ÇÇÜT., 2003). Pralin, farklı aromaların bir araya toplanılması ile oluşturulan lezzetli çikolata kaplamalı üründür. Pralin kendine has lezzeti için kahve, antepfıstığı, fındık, hindistan cevizi, mısır gevreği, portakal, kağı, lokum, sakız, ay çekirdeği vb. farklı ürünler kullanılır. Pralini çikolatadan ayıran en büyük fark, çikolataya göre çok daha fazla miktarda yağ içermesidir. Pralinin dolgu kısmı kakao içermemektedir, ayrıca kakao yağı yerine fındık yağı bulunur, tat ve aroması fındık yağından gelir. Çikolata ile pralin arasında maliyet farkı da vardır, çünkü, kaliteli bir kakao yağının maliyeti fındık yağından oldukça yüksektir (Tokuşoğlu, 2015).

2.2.4. Kakao ve çikolatanın sağlık üzerindeki etkileri.

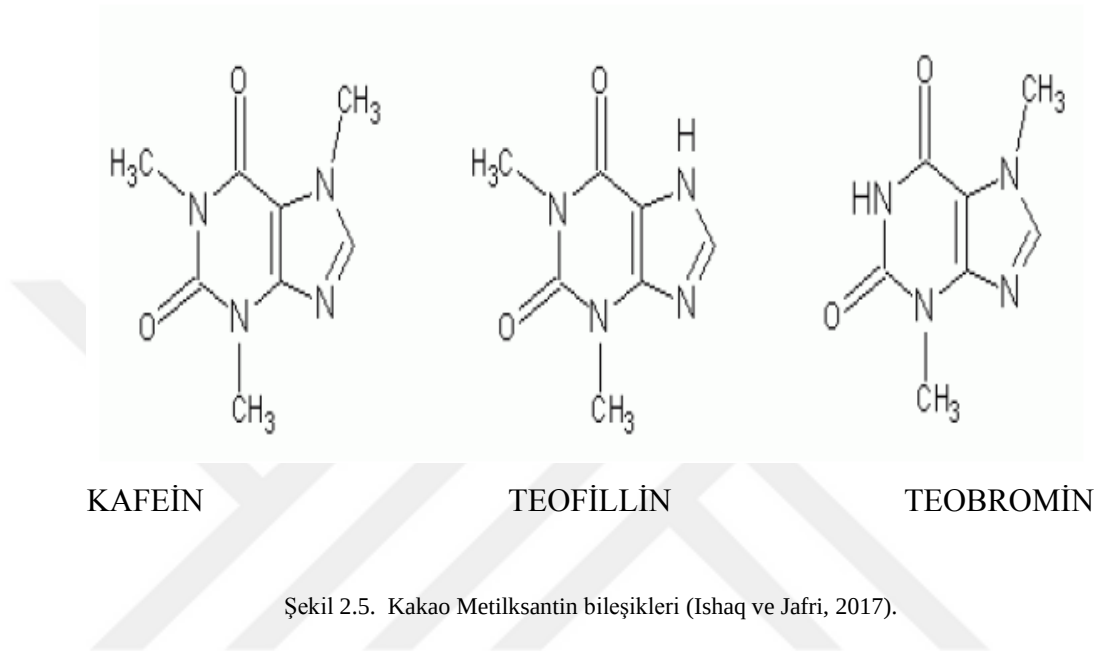
Kakao ağacı ilk kez Avrupa'ya 1505'te İspanyollar tarafından getirildi ve yaygınlaştırıldı. Daha sonra Avrupa'da 1653'te kakao, gıda haricinde ilaç olarak da kullanılmaya başlandı. 17. ve 18. yüzyılda çikolata, sindirimi düzenlemek, doğurganlığı artırmak, zihinsel performansı güçlendirmek, aynı zamanda soğuk algınlığından kaynaklanan her türlü rahatsızlık ve hastalık için düzenli olarak reçete edildi veya ilaçlara karıştırılmaya başlandı (Jalil ve Amin, 2008).

Günümüzde, kardiyovasküler sağlık üzerindeki olumlu potansiyel etkileri nedeniyle kakao ve kakao ürünlerine ilgi oldukça yüksektir. Bu etkilerin çoğu, kakaonun esas olarak flavonoidlerden oluşan polifenolik fraksiyonu ile ilgilidir (Lecumberri ve ark., 2007). Fermente edilmemiş kakao çekirdeği kuru kütlesi %12-18 oranında fenolik bileşiklere sahiptir, ve bu bileşiklerin en yüksek oranı flavan-3-oller (%37), antosiyaninler (%4) ve prosiyanidinler (%58)'dir (El Gharras, 2009; Ioannone ve ark., 2015). Bununla birlikte, tüm çikolatalar eşit flavonoid oranlarına sahip değildir. Bitter çikolata sütlü çikolatadan daha yüksek oranda kakao likörü ile formüle edildiği için, genellikle daha yüksek miktarda flavonoide sahiptir (Steinberg ve ark., 2003). Ayrıca beyaz çikolata, yağsız kakao parçacıkları içermez ve bu nedenle kakao polifenollerinden yoksundur (Rimbach ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, 15 gün

boyunca çikolata tüketen sağlıklı kişilerde polifenol bakımından zengin bitter çikolatanın (beyaz çikolata hariç) kan basıncını dūřurdūėu ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği tespit edilmiştir(Grassi ve ark., 2005). Fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, prosiyanidin açısından zengin kakao likörünün glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) aktivitesini artırarak hiperglisemiye ve tip 2 diyabeti önlediği öne sürölmüştür(Yamashita ve ark., 2019). Yapılan araştırmalar sonucunda, kakao ve bazı çikolata ürünlerinin diğer gıda kaynaklarıyla karşılaştırıldığında (meyveler, sebzeler, çay ve kırmızı şarap; 0.5-7.1 mg/g gallik asit eşdeğeri) en yüksek polifenol konsantrasyonlarına (flavonoidler, kateşin ve epikateşin; 3.3–60,2 mg/g gallik asit eşdeğeri) sahip olduğu belirlenmiştir (Shadwell ve ark., 2013). Çikolata ve kakao polifenollerinin insülin direnci ve diabetes mellitus üzerineki etkileri, glukoz emilimini ve insülinin hedef hücrelerde kullanımını arttırarak, dokularda glukoz kullanımını regüle ederek gerçekleştirmektedir (Comert ve Merdol,2018). Shrive ve ark.'nın (1988), yaptığı beř çalışmanın değerlendirildiği bir meta analizde, sağlıklı bireylerde kakao ve bitter çikolatanın homa insülin direnci testi (HOMA-IR) değerinde belirgin azalma sağlarken, glukoz düzeyleri ve kantitatif insülin duyarlılığı kontrol indeksinde (QUICKI) belirgin bir etki sağlamadığı tespit edilmiştir.

Çikolata tüketiminin insan sağlığı üzerinde yararlı etkisinin sebeplerinden biri de önemli ölçüde yüksek antioksidan özellikleri ile ilişkilendirilmiştir (Aktar, 2017). Kakao ürünlerinde özellikle çikolatada antioksidan aktivitenin çoğunluğunu prosiyanidinler sağlar (Ramiro-Puig ve Castell, 2009). Kakao esas olarak epikateşin ve kateşin monomerlerini ve bu monomerlerden türetilen prosiyanidinler olarak bilinen farklı polimerleri içerir. Prosiyanidinler, kakao ve çikolata ürünlerindeki başlıca flavonoidlerdir ve rapor edilen seviyeleri 2·16 ila 48·70 mg/g arasında farklılık göstermektedir (Gu ve ark.,2006). Kakao flavonoidlerinin, serbest radikalleri doğrudan nötrale ederek, reaktif oksijen türlerini güçlendiren metalleri (Fe²⁺ ve Cu⁺) şelatlayarak, reaktif oksijen türlerinin üretiminden sorumlu enzimleri (ksantin oksidaz) inhibe ederek ve antioksidan savunma sistemini düzenleyerek veya koruyarak antioksidan görevini yerine getirdiği ileri sürölmektedir (Cotella, 2001).

Kakao içeriğini oluşturan diğer bileşiklerden olan, metilksantinler (kakao tozunun %0.5–2'si), özellikle antioksidan özelliklerine yardım eden fitokimyasallardır (Azam ve ark., 2003). Kafein, teobromin ve teofilin kakaonun metilksantik bileşenlerini oluşturan alkoleidlerdir (Şekil 2.5.).



Kakao çekirdeğindeki esas metilksantin bileşeni, teobromindir ve kakonun kendine has bitter tadına katkıda bulunmaktadır. Kakao, kakao ürünleri ve çikolatada teobromin oranı kafeinle karşılaştırıldığında 10 kat daha yüksek olmasına rağmen, fizyolojik etkileri zayıftır. Metilksantinler psikolojik, fizyolojik etkilere sahiptir ve en çok bilinen etkileri beyin, iskelet kasları üzerinde olduğu araştırmalarla tespit edilmiştir. Özellikle uyarma, sakinleştirme, dikkat artıcılık, yoğunluğu azaltıcılık, solunum yollarını rahatlatıcılık, bağırsakları yumuşatıcılık etkilerini göstermektedir. Kakao ürünlerindeki metilksantinlerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi söz konusu olmayıp, aşırı kakao ve çikolata tüketilmediği sürece toksikolojik herhangi bir soruna yol açmamaktadır (Tokuşoğlu, 2015). Aynı zamanda son araştırmalar kakao tüketiminin vasküler ve trombosit fonksiyonunun, kan basıncı için oldukça faydalı olduğunu göstermektedir. Kakaonun yüksek miktarda ve kalitede antioksidan flavonoid içeriği ile LDL oksidasyonunu ve kardiyovasküler risk faktörlerini azalttığı belirlenmiştir. Kakaonun kardiyovasküler sağlık ve hastalık üzerinde yararlı

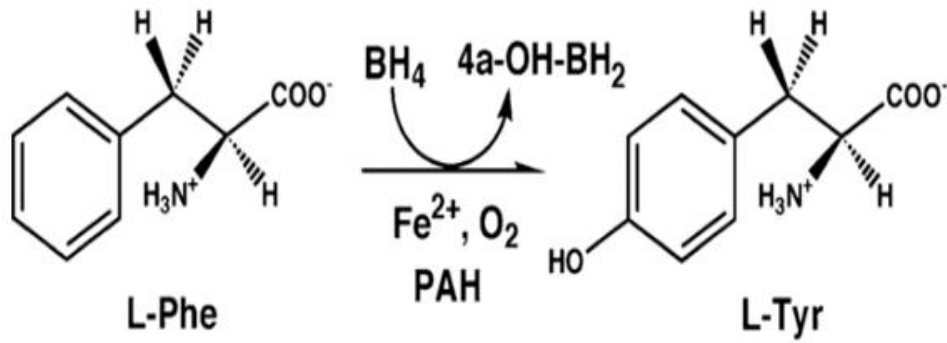
etkilerinin bir diğeri de endoteldeki nitrik oksidin (NO) biyoyararlanımındaki artıştır. Böylelikle vücuda alınan kakao, endotelyal NO sentaz (eNOS) ile NO sentezlemek için gereken yerel L-arginin seviyelerini artıran endotel hücrelerinde vasküler arginaz aktivitesini düşürmeye yardımcı olur. Endotelden gelen NO, damar düz kas hücrelerinin gevşemesine yardım ederek vazodilatasyona neden olur. Ayrıca NO vücutta lökosit yapışmasını ve göçünü, düz kas hücresi çoğalmasını ve trombosit yapışmasını ve agregasyonunu da önler. Sonuç olarak, kakaodaki flavanoller NO salınımını artırarak reaktif oluşumunu engellemektedir (Corti ve ark., 2009).

2.3. Fenilketonüri (Penilketonuria PKU)

Kalıtsal Metabolik Hastalıklar klinik ve genetik heterojenitenin en sık görüldüğü geniş bir hastalık grupudur. Bu grup hastalarda nöbet gibi nörolojik belirtiler, büyüme-gelişme geriliği ve psikomotor gelişimde bozukluklar en sık görülen ortak bulgular olarak tespit edilmiştir (Hampe ve ark., 2017). Kalıtsal metabolik hastalıklar grubu sistematik olarak, karbonhidrat metabolizma bozukluğu (glikojen depo hastalığı), protein metabolizma bozuklukları (fenilketonüri, tirozinemi, vb.), lizozomal depo bozuklukları (Gaucher hastalığı), organik asit metabolizma bozuklukları (alkaptonüri, metilmalonik, propiyonik vb.), üre döngüsü bozuklukları ve şeker intoleransları (laktoz intolerans, galaktozemi, hereditör früktoz intoleransı) şeklinde sınıflandırılır (Kara 2012, Gilbert-Barness ve Farrell 2016).

Protein metabolizma bozukluğu hastalıklarından biri olan PKU, PAH enzimidaki eksiklik ile karakterize edilen Phe düzeylerinin yükselmesi ve Try düzeylerinin azalmasıyla ortaya çıkan kalıtsal metabolik bir bozukluktur (Vockley ve ark.,2014). Karaciğerden sentezlenen fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin yokluğu veya yetersizliği nedeni ile elzem bir aminoasit olan Phe metabolize edilememektedir. Bundan dolayı, plazma fenilalanin düzeyi normalin 20-30 katı kadar artmakta, protein sentezi baskılanmakta, miyelin sentezi azalmakta, serotonin, dopamin ve norepinefrin nörotransmitterlerinde belirgin düşüslere sebep olmaktadır (Prasad ve ark.,1998). PAH normalde Phe'yi Tyr dönüştürdüğü için, kofaktör olan (6R)-1-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterine (BH4), moleküler oksijene ve aktif bölgeye bağlı, hem olmayan

+2 değerlikli demire (Fe^{+2}) ihtiyaç duyar. PAH enzimi oksijen molekülünden aldığı oksijen atomunu hidroksile ederek Phe'e ilave eder ve Şekil 2.6.'da gösterildiği gibi Phe'yi Tyr'ne dönüştürür (Kim ve ark., 2004).

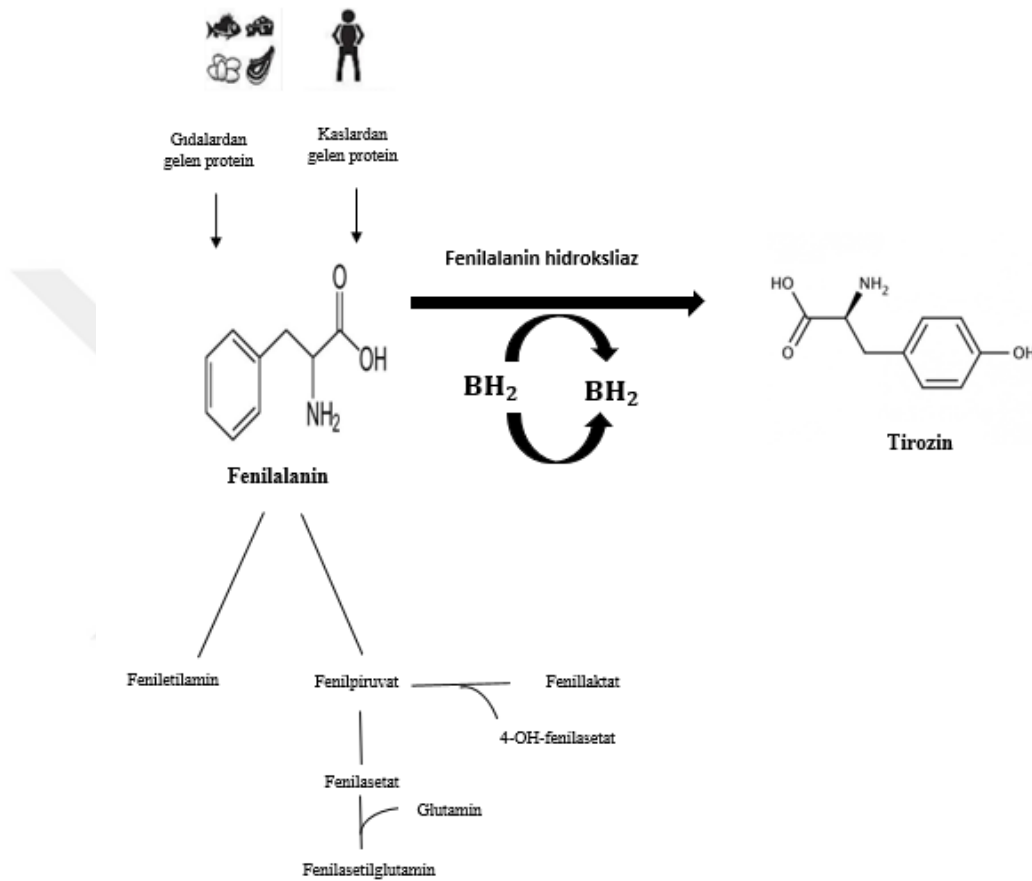


Şekil 2.6. Fenilalaninin tirozine dönüşüm reaksiyonu (Kim ve ark., 2004).

Ayrıca, BH 4 hidroksilasyon reaksiyonu esnasında kininoid dihidrobiopterine (qBH 2) oksitlenir. Bu reaksiyon ile PAH verimli bir şekilde ilerlemesi için qBH2 biopterinin tetrahidro formuna indirgenmesi gerekmektedir. qBH2'nin indirgenmesi için ise dihidropteridin redüktaz (DHPR) tarafından katalize edilmelidir. Bu reaksiyonda BH4, GTP-siklohidrolaz I, 6-piruvoyl-tetrahidropterin sentaz ve diğer enzimlerin sıralı etkisi ile novo sentezini hayata geçirir. Aynı zamanda, BH4 dopamin ve serotonin nörotransmitterlerinin sentezi için gerekli olan diğer iki hidroksilaz enzimini, Try hidroksilaz ve triptofan hidroksilaz için kofaktör rolünü oynar. Bu nörotransmitterler ise özellikle sinaptik iletim ve beyin fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Daha az yaygın olarak hiperfenilalaninemiyi (HPA), DHPR'nin sebep olduğu genetik kusurlardan veya BH 4 sentezini katalize eden diğer enzimlerden de kaynaklanır, bunlar da yetersiz dopamin ve serotonin sentezi ile alakalıdır. Böylelikle Şekil 2.7.'de gösterildiği gibi vücutta fazla Phe, fenilpiruvik asit fenillaktik asit, fenilasetik asit ve diğer metabolitlerin birikmesine yol açar (Kaufman, 1989).

PKU hastalarında ve PKU olmayan hiperfenilalaninemi hastalarının önemli bir kısmında, Phe birikimi PAH aktivitesinin azalması veya olmamasından kaynaklanan

başlıca sebeptir. Sonuç olarak, PAH eksikliği kanda ve beyinde Phe birikimine neden olur ve diyet kısıtlaması olmadıkça PKU, geri dönüşü olmayan zihinsel engellilik, mikrosefali, motor yetersizlikler, egzamatöz döküntü, otizm, nöbetler, gelişimsel sorunlar, anormal davranışlar ve psikiyatrik semptomlarla sonuçlanır (Blau ve ark., 2010a).



Şekil 2.7. İnsanda fenilalanin metabolizmasının yolu (Kaufman, 1989).

2.3.1. Fenilketonuria hastalığının tarihçesi, tanı ve belirtileri.

PKU, 1934'te Asbjorn Folling tarafından, bazı bireylerin idrarında fenilketon cisimlerini tespit ederek tanımladı ve 1953'te ise Bickel, PKU'lu bir çocukta düşük Phe diyetinin etkinliğini ilk kez bildirdi. Daha sonra 1960'larda Guthrie, büyük popülasyonlarda HPA belirlemek için basit bir test geliştirdi. Guthrie testi ile PKU, yenidoğan taraması ile metabolik hastalıklardan yararlanan ilk genetik bozukluk oldu ve böylelikle erken teşhisin, tedavinin zeka geriliğini önlemeye yardımcı olduğunu

ispatlandı (Blau ve ark., 2011). Yüksek kan Phe düzeylerinin toplum çapında taranmasını sağlayan bu tanı testi 1960'ların başlarından itibaren geniş çapta klinik uygulamaların başlamasına sebep oldu. Bu test 1965'te 32 ABD (Amerika Birleşik Devletleri) eyaletinde ve 1970'lerin sonlarında ise Avrupa'da tanıtıldı. PKU için yenidoğan taraması, yalnızca dünyadaki gelişmiş ülkelerin çoğu tarafından değil, aynı zamanda gelişmekte olan birçok ülke tarafından da kademeli olarak uygulandı (Brosco ve Paul, 2013 ; Battelino ve ark.,1994). Ayrıca, bu ülkelerde Guthrie testinden elde olunan büyük başarılar, diğer bozuklukların tespit olunması, yenidoğan tarama testlerinin gelişim süresini ve uygulama aralığı oranlarını kesin olarak etkiledi. Guthrie testi olarak bilinen orijinal, yarı niceliksel test, bir bakteriyel inhibisyon analizine dayalıdır ve kitle taramasını basit, ucuz ve çok uygun maliyetli hale getirmektedir. Guthrie testi yavaş yavaş (ancak tamamen değil) kromatografi, florometri ve daha yakın zamanda tandem kütle spektrometrisi gibi daha yeni yöntemlerle değiştirildi ve doğuştan metabolizma bozuklukları (inborn errors of metabolism IEM) yenidoğan tarama programlarının genişletilmesine sebep oldu (Blau ve van Spronsen 2010b). PKU hastalar için yenidoğan taramasının başlatılması, gelişmekte olan bir ülkede uygun maliyetli bir uygulamadır (Sladkevicius ve ark.,2010). Bu testin en büyük avantajı yaşamın erken dönemlerinde yapılabilmesidir, çünkü bir bebekten bir damla kan taze bir idrar örneğinden daha kolay elde edilir (Amdrup ve Jorgense, 1957). Kan alınmadan önce bebeğin emzirilmesi PKU tanısı için oldukça önemlidir. Böylelikle, bebeğin aldığı fenilalanin ile gerçekleşecek metabolik gelişim gözlemlenmiş olacaktır (Groselja ve ark., 2014). Yaygın kullanılan Guthrie testinde Phe seviyesinin tayini için topuktan alınan bir damla kılcal kan özel filtre kağıdı üzerinde kurutulur ve merkezi bir laboratuvara gönderilir (Amdrup ve Jorgense, 1957).

Test için kurutulmuş kan diski, bir büyüme inhibitörü olan B-2-tienil-alanin varlığında bakterilerle (*Bacillus subtilis*) kaplanmış bir petri kabı üzerinde inkübe edilir. Kan örneğindeki yüksek Phe seviyeleri bakterilerin büyümesine izin verir. Disk etrafında bakterinin ürediği alan ile, belirli miktarda Phe içeren kontrol bir disk etrafında bakterinin ürediği alanının karşılaştırılması yapılır. Bebekten alınan kandaki Phe miktarı ile ilintili olarak disk etrafındaki bakterinin ürediği alanda büyüme, genişleme olur. Erken tanı için test örneklerinin doğumdan 24 saat sonra veya 72 saatlik süre

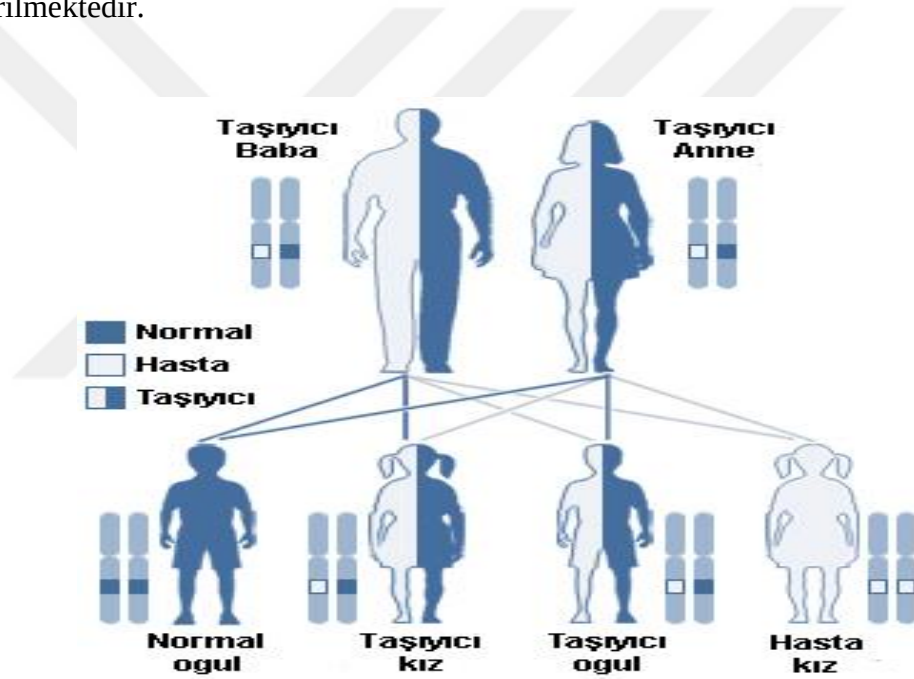
içerisinde alınması, özellikle yalancı negatif sonuçlarını ortadan kaldırmak, proteinle beslenmeyi önlemek için oldukça önemlidir. Guthrie testi pozitif olan çocuklarda kan plazma Phe düzeyi kantitatif olarak kontrol edilmelidir (Clarke, 2000; Nagasaka ve ark., 2011).

PKU hastalığı olan yeni doğan çocuklar ilk aylarda sağlıklı bireylerden ayırt edilmezler ancak ilerleyen zaman içinde hastalık belirtilerini göstermeye başlar. Hastalığın belirtileri; melanin pigmenti sentezinin azalması sebebiyle cilt, saç ve gözlerin ebeveynlere göre daha açık renkte olması, idrar ve terin küf ya da ölü fare gibi kötü kokması, yürümede ve oturmada zorluk, gelişim ve zeka geriliği, agresif ve otistik davranışlar, hiperaktivite, dikkat eksikliği, beyin elektroensefalografisinde (EEG) anormallikler, havale, kusma ve dermatolojik rahatsızlıklar şeklinde kendini gösterir (Seçkin ve Erturan 1999, Uskun 2001, Yazgan 2003, Tanzer 2007, Cleary 2014, Pimentel ve ark., 2014, Strisciuglio ve Concolino 2014, Liemburg ve ark., 2015). Özellikle çocukluk döneminde PKU yakından takip edilmezse ve plazma Phe konsantrasyonunun sık sık önerilen konsantrasyonun üzerine çıkmasına izin verilirse, bu bir miktar geri dönüşümsüz bozulmalarla sonuçlanır (Walter ve ark., 2002). Geri dönüşü olmayan hasarı (örn. nörolojik bozukluk ve zeka geriliği) önlemek için, PKU tedavisi doğumdan sonra ilk 10 günü içinde başlamalı, (yenidoğan tarama programları aracılığıyla zamanında tanı konulmasını gerektirir) nöropsikolojik ve nörobilişsel semptomları kontrol etmek için ise yaşam boyunca sürdürülmelidir (van Wegberg ve ark., 2017).

2.3.2. PKU'nin dünyada ve türkiyede görülme sıklığı

PKU, Kuzey Avrupa ve Kızılderili kökenli bireylerde daha yaygın olmasına rağmen, tüm etnik gruplarda da görülen bir hastalıktır. Bu hastalığın Afro-Amerikan, Hispanik ve Asya kökenlilerde görülme sıklığı daha düşüktür. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde PKU'nun genel prevalansı yaklaşık 10.000 doğumda 1 tespit edilmektedir. Akraba evliliğinin yaygın olduğu kültürlerde daha yüksek hastalık insidansı görülmektedir. Örneğin Türkiye, Suudi Arabistan veya Gazze; yaklaşık 3500-6500'de 1, olmasına rağmen Finlandiya gibi ülkelerde bu insidans çok daha

düşüktür 100.000'de 1'r (Smith ve ark., 1991). Dünyada ortalama her 50 kişiden birinin PKU taşıyıcısı olduğu, ancak her iki taşıyıcının bir araya gelme ihtimalinin 1:2500 olduğu belirtilmektedir (Web-1, 2016). PKU'lu bireylerin ebeveynlerinde, fenilalanin hidroksilaz enziminin üretiminden sorumlu olan, biri sağlıklı, diğeri ise kusurlu olmak üzere iki gen bulunur ve her iki ebeveyninden de kusurlu genleri alan çocuklar PKU'lu olarak dünyaya gelir. PKU hastalığı taşıyıcısı olarak doğan, yani kusurlu genlerden sadece birini taşıyan anne ve babalardan yalnızca sağlıklı genleri alan çocuklar tamamen sağlıklı doğarlar. Taşıyıcı anne ve babanın hasta çocuklarının olma olasılığı %25 olarak görülmektedir (Köksal ve Gökmen, 2015). Şekil 2.8.'de PKU'nun bireylere genetik olarak geçişi (otozomal resesif gen aktarımı) şematik olarak verilmektedir.



Şekil 2.8. PKU hastalığının otozomal resesif genetik çaprazlama sonucu geçişi (Anonim, 2018).

Akraba evliliklerinin görülme sıklığının yaygın olması nedeniyle Türkiye klasik fenilketonüri insidansının en yüksek (1/4500) olduğu bir ülkedir (Giovannini ve ark., 2007). Türkiye'nin en önemli tarama merkezlerinden Hacettepe Tarama Merkezi'nde Guthrie testi ile 1.605.582 bebekten 383'ünde hiper fenilalanin (4000'de 1'e çok yakın) belirlenmiştir (Özalp ve ark., 2001). Türkiye'de akraba evlilikleri üzerine yapılan bir araştırmada, akraba evliliklerinin en yüksek oranda görüldüğü bölge %33 ile Doğu Anadolu Bölgesi olarak saptanmıştır. Bu verileri %32.6 ile Karadeniz Bölgesi

izlemektedir. Ege Bölgesi'nde bu oran %1.4 olarak görülmüştür (Tabak, 2008). Yapılan başka bir araştırmada akraba evliliği sonucu dünyaya gelen çocuklarda genetik hastalık görülme oranı %10.7 iken, akraba olmayan ailelerin çocuklarında hastalık oranı %3.7 olarak belirlenmiştir (Arslan, 2010). Bu bağlamda, Türkiye'de ve birçok gelişmiş ülkede, PKU için akraba evliliğinden olan yeni doğan bebeklerde tarama testleri zorunlu olarak yapılmaktadır (Başaran ve ark. 1992). T.C Sağlık Bakanlığı 1993'de tüm Türkiye kapsamında fenilketonüri tarama programını başlatmıştır. Türkiye'de dört Yenidoğan Tarama Merkezi vardır ve bunlar Hacettepe Tıp Fakültesi-Ankara, İstanbul Tıp Fakültesi-İstanbul, Dokuz Eylül Tıp Fakültesi-İzmir, Cumhuriyet Tıp Fakültesi-Sivas'dır (Anonim 2017).

Türkiye'de ve tüm dünyada PKU'nin kabul gören tedavi şekli tanı koyulduktan hemen sonra düşük proteinli gıdalarla beslenmektir. Bu bağlamda, proteini ve Phe' ni azaltılmış ürünlere ulaşmak ve temin etmek önem arz etmektedir. Ülkemizde sadece belli markalar tarafından üretilen veya yurtdışından getirilen düşük proteinli ürünler PKU hastalarına ulaşılabilir. Ne yazık ki, PKU' lu hastalar için üretilmiş tamamı ithal olan bu ürünlerin fiyatlarının son derece yüksek olması, hastaların kolaylıkla bu ürünlere ulaşımını engellemektedir (Güney, 2019).

2.4. Fenilketonüri (PKU) Hastaları İçin Tedavi Yöntemleri

PKU tedavi edilebilir bir hastalıktır: erken ve sürekli olarak tedavi edilen PKU hastalarının ergenlik çağında normal bir entelektüel seviyeye (IQ) sahip olması için sıkı bir diyetle uymaları zorunludur (Burgard, 2000). Yani, doğumdan sonra yaşamın ilk birkaç haftasında uygulanan, yaşam boyunca sürdürülen ve yenidoğan taraması ile belirlenen Phe kısıtlı terapötik diyet PKU'nun en şiddetli klinik belirtilerini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Scriver ve Kaufman, 2001). Bu bağlamda, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) 2000 yılında PKU'nun taranması ve yönetiminde ilk ulusal Uzlaşma Beyannamesi'ni geliştirerek, kan Phe konsantrasyonunun 12 yaşın altındaki çocuklar için 120-360 $\mu\text{mol/L}$ (2-6mg/dL), daha büyük çocuklar için 120-600 $\mu\text{mol/L}$ (2-10 mg/dL), gebe kalmadan üç ay önce ve gebelik boyunca 120-240 $\mu\text{mol/L}$ (2-6 mg/dL) aralıklarında olmasını önermiştir (Bowersox, 2000). Sonuç itibarı ile, PKU

tedavisinin ana hedefleri kan Phe konsantrasyonunu güvenli sınırlar içinde tutarak (yani 120-360 mmol/L; hamile kadınlar için 120-240 mmol/L) zeka geriliği önlemek, yetişkinlik boyunca normal büyümeyi ve normal yaşamı sağlıklı bir şekilde sağlamaktır (Scriver ve ark. 1995). Sağlıklı yeni doğan bebeklerde kan fenilalanin konsantrasyonu 2 mg/dL (120 μ mol/L) oranından daha düşük olmaktadır (Blau ve ark., 2014). Bu bakımdan, fenilalanin oranı 2-10 mg/dL (120-600 μ mol/L) aralığında olan bireyler hiperfenilalaninemi, 10-20 mg/dL (600-1200 μ mol/L) aralığında olanlar orta dereceli PKU, 20 mg/dL (1200 μ mol/L) değerinden daha yüksek olan bireyler ise klasik PKU hastası olarak tanımlanmıştır (Kara 2012, Trunzo vd 2015).

PAH aktivitesi kişiden kişiye değişir, bu nedenle PKU tedavisinde diyet alımı, ağırlık ve günlük serum fenilalanin seviyeleri tedavi planının bireyselleştirilmesinde özellikle önemlidir (Sullivan ve Chang, 1999). Çocukluk ve ergenlik döneminde sınırlı PKU tedavisi ile fenilalanin diyeti uygulayan hastalarda bu tedaviyi bırakan hastalar arasında yapılan bir karşılaştırmada mental bozukluk, hiperaktivite, hipoaktivite ve baş ağrısı oranlarında azalma tespit edilmiştir. Yapılan karşılaştırmada, tedavinin doğum günlerinde başlarsa daha iyi zihinsel işlevselliğe yol açtığını, ancak tedaviye 3 yaşından sonra başlanırsa çok az klinik fayda elde edildiğini rapor edilmiştir. Ayrıca hasta büyüdükçe, sindirilen fenilalanin yüzdesi artar ve metabolize olmaya devam eder, daha az birikir bu yüzden ergenlik döneminde de tedaviye devam edilmesi bireyler için çok büyük fayda sağlar (Waisbren ve ark., 2007).

Bu bağlamda, PKU hastaları için, gen tedavisi, enzim tedavisi ve diyet tedavisini içeren üç teatral veya pratik tedavi türü geliştirilmiştir. Gen terapi henüz araştırma, test aşamasındadır ve diğer tedavi yöntemleri başarısız olmadığı sürece uygulanma olasılığı düşüktür (Fang ve ark., 1994). Enzim terapi ise çok uzun ekstraksiyon ve saflaştırma adımlarını içeren uzun ve hassas enzim üretim prosedürü nedeniyle zaman alıcı ve pahalıdır. Enzim tedavisi, PAH enziminin değiştirilmesiyle veya fazla fenilalanin'i parçalamak için başka bir enzimle ikame edilerek yapılmaktadır (Sarkissian ve ark., 1999). Düşük fenilalaninli diyet tedavisi 1950'lerde başlatılmış (Bickel ve ark., 1953; Armstrong ve Tyler 1955) ve doğru bir şekilde tedavi edilen hastalarda zeka geriliğini önlediği tespit edilmiştir (MacCready 1974; Scriver ve

Kaufman, 2001). İlk yıllarda özel diyet en erken 3-4 yaşlarında aralıklı olarak uygulanmış, daha sonra sürekli diyet tedavisinin çok daha yüksek etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bugün ömür boyu Phe kısıtlı diyetle beslenme politikası tüm dünyada kabul edilmekte ve uygulanmaktadır (van Calvar, 2012).

PKU diyet tedavisinde besin gereksinimleri için 3 yoldan biri izlenebilir:

- 1 Günlük verilen Phe miktarı sınırları içinde 10 g'dan az protein gereksinimi sağlanacak şekilde protein ve fenilalanin içeriğine dayalı gıda tüketimi
- 2 Protein açısından doğal olarak çok düşük Phe içeren gıdaların serbest alımı
- 3 Fenilalanin içermeyen, eser mineraller, vitaminler ve tüm L-AA'ları içeren proteinler veya peptitler içeren besin takviyeleri (MacDonald ve ark., 2011).

Sonuç itibarıyla, PKU diyeti için kullanılan besin takviyeleri, ya tamamen fenilalanin içermeyen veya düşük miktarlarda fenilalanin içeren, aynı zamanda oligopeptitleri ve protein hidrolizati içermeyen dengeli bir serbest sentetik AA karışımını içermelidir (Lara ve ark., 2005). Bu ise, protein eşdeğerlerinin %50 ila %90'ını, vitaminlerin ve eser elementlerin %90 ila %100'ünü ve gerekli enerjinin %50 ila %70'ini sağlamaktadır (Lopes ve ark., 2006).

Et ve et ürünleri, deniz ürünleri, yumurta, süt ve süt ürünleri, kabuklu yemişler ve ekmek gibi protein açısından zengin besinler (Waisbren ve ark., 2007) ve aspartam içeren içeceklerin yanı sıra soya, un, bira gibi gıdalar PKU'lu bireyler için yasak ürünlerdir (Giovannini ve ark., 2012). Sadece rafine şeker, yağ, nişasta Phe içermeyen gıdalardır ve bu ürünlere herhangi bir limit koyulmaz (Sullivan ve Chang 1999). Fenilalanin eksikliği olan insanlar için formüle edilmiş gıdalar yalnızca şeker ve şekere dayalı içecekleri veya yağ bazlı gıdaları içerirse, bu ürünlerin büyük miktarlarda tüketilmesi tüketici için çok zor olacaktır ve bu sebeple de tavsiye edilmez (van Calcar ve Ney 2012).

2.4.1. Fenilketonüri (PKU) hastaları için gıda üretim metotları

PKU hastaları için formüle edilmiş gıdalar 2 farklı şekilde üretilir:

Bazı yiyecek ve içecekler özellikle fenilalanin hariç tüm besin takviyelerini içermektedir. Bu çeşit ürünlere: tüketime hazır gıdalar, barlar, su veya meyve suyu gibi bazı içeceklerle karıştırılarak hazırlanan tozlar olmakla farklı şekillerde mevcut ürünleri örnek verebiliriz (van Calcar ve Ney 2012).

Bazı ürünler ise fenilalanin içeriğini azaltmak için modifiye edilmiş ürünlerdir. Bu tip gıdalar, protein içeriğinin hidrolize edilmesi veya düşük fenilalanin içeren protein ikamelerinin kullanılmasıyla üretilmektedir (van Calcar ve Ney 2012).

Modifiye edilmiş gıdaların günlük tüketimine yalnızca minimum miktarda izin verilir ve bu ürünler PKU bireylerinin tüketmemesi gereken geleneksel ürünlerin yerini almaktadır. Bu ürünlere et ve peynir ikameleri, pilav, makarna, kurabiye, ekmek, pizza hamuru ve kraker gibi unlu mamuller, un ve fıstık ezmesi gibi gıdaları örnek verebiliriz (van Calcar ve Ney 2012).

Fenilalanin içermeyen veya düşük fenilalaninli proteinler ve peptitleri içeren gıdalar, yalnızca temel amino asitleri sağlamakla kalmaz, aynı zamanda gıdalarda çeşitlilik sağlamak için gereken fonksiyonel özellikleri de verir (van Calcar ve Ney 2012). Bu nedenle PKU tedavisinin temel taşı olan Phe içermeyen L-amino asit takviyeleri oluşturan düşük Phe içeren diyet oluşturur. Bir çok PKU merkezleri, alternatif diyet takviyeleri olarak kazein glikomakropeptid (GMP) veya büyük nötr amino asitler (LNAA) kullanmaktadır (Blau ve van Spronsen, 2010b).

Erken bebeklik döneminde bireylere Phe gereksinimlerini karşılamak için anne sütü veya standart bebek formülleri verilir. Katı gıdaların (sütten kesme) başlangıcına kadar her iki ürüne Phe içermeyen L-AA bebek maması diğer beslenme gereksinimleriyle bireysel toleransa göre seyreltme yapılarak katılır (Roshia ve MacDonald, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşik Krallık Beslenmeyle ilgili Bilimsel Danışma

Kurulu (2018), süttten kesmenin 6 aylıkken (≈ 26 hafta) başlaması gerektiğini tavsiye etmektedir (Thomas ve Anne, 2018). Alternatif olarak, Avrupa Pediatrik Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Derneği (ESPGHAN), 17 ila 24 hafta arasında süttten kesmeyi doğru olduğunu savunmaktadır (Agostoni ve ark., 2008). PKU'lu bebekler zaten ilk zamanlardan itibaren Phe'siz L-AA bebek maması şeklinde tamamlayıcı gıdalara maruz kaldığından, süttten kesmenin başlaması için kesin yaş halen tanımlanmamıştır (McDonald ve ark., 2012).

Birkaç yıl öncesine kadar beslenme uzmanlarının, araştırmacıların ve üreticilerin temel hedefi PKU'lu hastaları mental yavaşlamaya karşı korumaktı. Bu bağlamda sadece Phe amino asidi ve protein miktarı üzerine diyet planları ve üretimler yapılmaktaydı. Günümüzde ise PKU lu hastalar için hazırlanan veya üretilen ürünlerin düşük Phe içermelerinin yanı sıra yeterli düzeyde enerji ve mikro besin öğelerini de kapsayan, hastaların yaşam kalitesini arttıran ürünler üzerinde durulmaktadır (Pimentel ve ark., 2014). Özellikle Glikomakropeptid (GMP), Phe içermeyen amino asit (AA bazlı) gıdaların üretimi için uygun olan bir peptittir. Yapısı 64 AA'dan oluşur ve peynir altı suyundaki protein içeriğinin %15 ila %20'sini oluşturan glikofosopeptittir. GMP, içeriğindeki tirozin, triptofan ile ve özellikle de fenilalanin gibi aromatik AA'lari içermeyen benzersiz bir AA profiline sahiptir, ancak treonin ve izolösin oranı oldukça yüksektir (Ettel 2004). GMP, asitlerde çözünürlük (izoelektrik noktası = 2.8), köpük veya jel oluşturma, pudingler ve içecekler gibi yarı katı ürünleri kullanıma uygun hale getiren uygun ısı stabilitesi gibi fonksiyonel bir takım özelliklere sahiptir. GMP ile üretilen çikolatalı içeceklerde, bu peptit süt lezzetini kamufle etmeye yardımcı olarak çikolata lezzetini artırır (Lim ve ark., 2007). Günümüzde, GMP'den farklı puding türleri, atıştırmalıklar, şişirilmiş tahıllar, içecekler, krakerler ve salata sosları içeren diğer gıda ürünleri ve içecekler üretilmiştir (van Calcar ve Ney 2012).

1953 'te başka bir alternatif gıda üretim metodu gibi diyet fenilalanin kısıtlamasının üstesinden gelmek amacıyla büyük nötr amino asitler (LNAA) ile tedavi yöntemi geliştirildi. LNAA' ler lösin, izolösin, teronin, tirozin, metionin, triptofan, valin ve histidin gibi fenilalanin dışındaki temel AA'ları içerir. LNAA tedavisi, AA profillerini iyileştirerek, dopamin ve serotoninin öncüleri olan kandaki tirozin ve triptofan

konsantrasyonlarını artırmaya yardımcı olur (Koch ve ark., 2003). Yapılan bir araştırmada, LNAA takviyesinin PKU'lu bireylerde nöropsikolojik semptomları ve elektroensefalografik anormallikleri iyileştirdiği tespit edilmiştir (Yano ve ark., 2012).

Bazı hastalar farmasötik bir şaperon (sapropterin dihidroklorür olarak reçete edilir) görevi gören BH4'e yanıt verir ve bu sebeple BH4 ile tedavi edilir. PKU'nun BH4 ile tedavisi, 1999'da Kure ve arkadaşlarının raporuyla başlayan yeni bir yaklaşım olmuştur (Kure ve ark., 1999). PAH enzimi için gerekli olan kofaktör BH4 tedavisinin PKU hastalarında kan fenilalanininde %30 azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Hastalarda BH4 tedavisine yanıt değişkendir ve genellikle hafif formda bir PKU teşhisi konan hastalarda pozitif yanıt gözlemlenmiştir (MacLeod ve Ney 2010).

Öte yandan, PKU diyetleri ile birlikte, son zamanlarda kullanılan PAL(phenylalanine lyase) oral tedavisi PKU yönetimi için istifade edilen diğer bir yoldur. PAH'ın aksine, oral tedavide PAL kofaktöre ihtiyaç duymadan Phe'i metabolik olarak sınırlı miktarlarda trans-sinamik asit ve amonyağa dönüştürür. Böylelikle de, bu trans-sinamik asidin benzoik aside ve ardından hippurata dönüştürülmesi ile sonuçlanır ve idrarla hemen atılmasına yol açar. PAL, kandaki fenilalanin konsantrasyonunu düzenler ve Phe hidrolize eder. Bu nedenle, oral PAL ve düşük protein seviyesi ile kontrollü diyet kombinasyonu diyet fenilalanininde de ciddi sınırlama olmaksızın in vivo Phe konsantrasyonunu kontrol edebilmektedir (Sarkissian ve ark., 1999). Ancak, oral yolla verilen PAL enzim miktarının fazla olması ve bazı bireylerde enzimin intestinal proteazlara karşı hassasiyet göstermesi sebebiyle bu tedavi yönteminin yeterli etki göstermediği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Lam ve ark., 2008; Goldson ve ark., 2008; Cliff ve ark., 2016).

Sonuç itibari ile, hastalarda farklı yöntemlerle üretilen PKU gıdalarına karşı bağlılık, diyetteki kalsiyum, demir, selenyum, çinko, kolesterol, doymuş ve çoklu doymamış yağlar, taurin, karnitin ve C, B2, B6, B9 (folat), B12, A, D ve E vitaminlerini azalmasına sebep olur. Bunun nedeni, sağlıklı pediatrik popülasyona göre hastalarda daha yüksek oranda karbonhidrat ile beraber hayvansal gıdaların sınırlı miktarda tüketimidir. Bu nedenle, günlük mikro besin takviyesine ve diyet için uzun

sürekli talimatlara ciddi bir ihtiyaç vardır. Ama uzun soluklu ve başarılı diyet yönetimi PKU hastaları için oldukça zorlayıcıdır. Bu zorluğun önemli nedenleri PKU lu hastalar için üretilmiş gıda çeşidinin az, maliyetli ve organoleptik açıdan zayıf olmasıdır (Soltanizadeh ve Mirmoghhtadaie, 2014). Buna rağmen, özel diyet ürünlerinin geliştirilmesi ve bulunabilirliğinin artması ile birlikte PKU’lu hastalar için üretilmiş gıdaların küresel pazarının oluşması mümkündür. Bundan dolayı diyet yönetimi konusunda uluslararası fikir birliğine ihtiyaç vardır (Ahring ve ark., 2009).



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kakaonun yapısından ve kakao tozu üretiminde kakao çekirdeğine uygulanan ısıtıl işleminden dolayı kakaonun suda çözünürlüğünün düşük olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, araştırmada materyal olarak kullanılan Cacao Barry, Barry Callebaut (Fransa) markasının çekirdeklerinden elde edilen kakao tozu Eskişehir'den temin edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Caco Barry (Extra Brute), Ham kakao tozu.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler

Bu çalışmada, sprey kurutucu (büchi B-290, Büchilabortechnik AG, Flawil, İsviçre) ve çikolata yapımı için melanjör (Santha) kullanılan başlıca cihazlardır. HPLC (Hitachi Lachrom Elite, L-2130 HTA pompa, floresans dedektor (Hitachi Chromaster 5440), 3,5µm çapında Kromasil 100 C18, L-2300 kolon fırını), etüv (Elektro-Mag M 6040 BP), pH metre (Toledo), kontak termometreli elektronik ısıtıcı manyetik

karıştırıcı (IKA ETS-D5), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (MS300HS), soğutmalı santrifuj cihazı (Hettich Universal 320R), çalkalamalı su banyosu (JSR JSSB-30T), vortex (Labtech LVM-202), elek (Jeotest 4.0 laboratory test Sieve), hassas terazi (OHAUS EX324), filtre (ChromofilXtra Pet 45/25 0,45 µm), spektrofotometre (Shimadzu UVmini-1240), rotary evaporatör (Buchi R-3), soxhlet yağ tayin cihazı (Eflab), mikser (Fakir-Mezza plus), ultrasonik banyo (BandelinSonorex, RK 100H) analiz için kullanılan diğer cihazlardır.

3.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Aşağıda nasıl hazırlandığı belirtilen ve çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich ve Merck'den tedarik edilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada kullanılan enzimler, Amilaz ag 300 l (300 AGU / mL), Viskozim L (≥ 100 fbgu / g) ve Alkalaz (2.4 AU / g) Novozymes Enzim Dış Ticaret Limitet Şirketin'den sağlanmıştır. (İstanbul, Türkiye).

- %75'lik Metanol Çözeltisi: 750 mL metanol balon jojeye aktarılmış ve üzerine distile su aktararak 1000 mL'ye tamamlanmıştır.
- DPPH Çözeltisi: 5 mg DPPH, % 75'lik metanol çözeltisi kullanılarak 250 mL'lik balon jojeye tamamlanmıştır.
- 2M Fosforik H_3PO_4 Çözeltisi: 22.25 ml fosforik asit 500 mL'lik balon jojede saf su ile hacim çizgisine tamamlanmıştır.
- 2M $Ca(OH)_2$ Çözeltisi: 37.05 g $Ca(OH)_2$ 500 mL'lik balon jojede saf su ile hacim çizgisine tamamlanmıştır.
- Folin Ciocalteau Reaktifi: Satın alındığı şekliyle analiz için kullanılmıştır.
- %20'lik Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) Çözeltisi: 20 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) tartılarak 100 mL'ye distile su ile balon jojede tamamlanmıştır.

- -1,5 mM Demir II Sülfat (FeSO_4) Çözeltisi: 41,703 mg FeSO_4 , 100 mL' lik balon joje kullanılarak hacim çizgisine distile su ile tamamlanmıştır.
- 40 mM Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi: %37'lik HCl' den 340 μL alınarak 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.
- -10 mM TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-Triazine) Çözeltisi: 156,15 mg TPTZ 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 40 mM HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır.
- FRAP Reaktifi: Hazırlanan TPTZ, FeCl_3 ve asetat tamponu çözeltileri
- sırasıyla 1:1:10 oranında karıştırılarak reaktif hazırlanmıştır.
- Gallik asit standard stok çözeltisi: 5 mg gallik asit, 10 mL %75 metanol çözeltisinde çözündürülmüş ve gerekli seyreltmeler yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.
- FeSO_4 standard stok çözeltisi: 10 mg FeSO_4 , 10 mL %75 metanol çözeltisinde çözündürülmüş ve gerekli seyreltmeler yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.
- Troloks standard stok çözeltisi: 5 mg troloks, 50 mL %75 metanol çözeltisinde çözündürülmüş ve gerekli seyreltmeler yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

3.2.3. Düşük proteinli kakao tozu üretimi

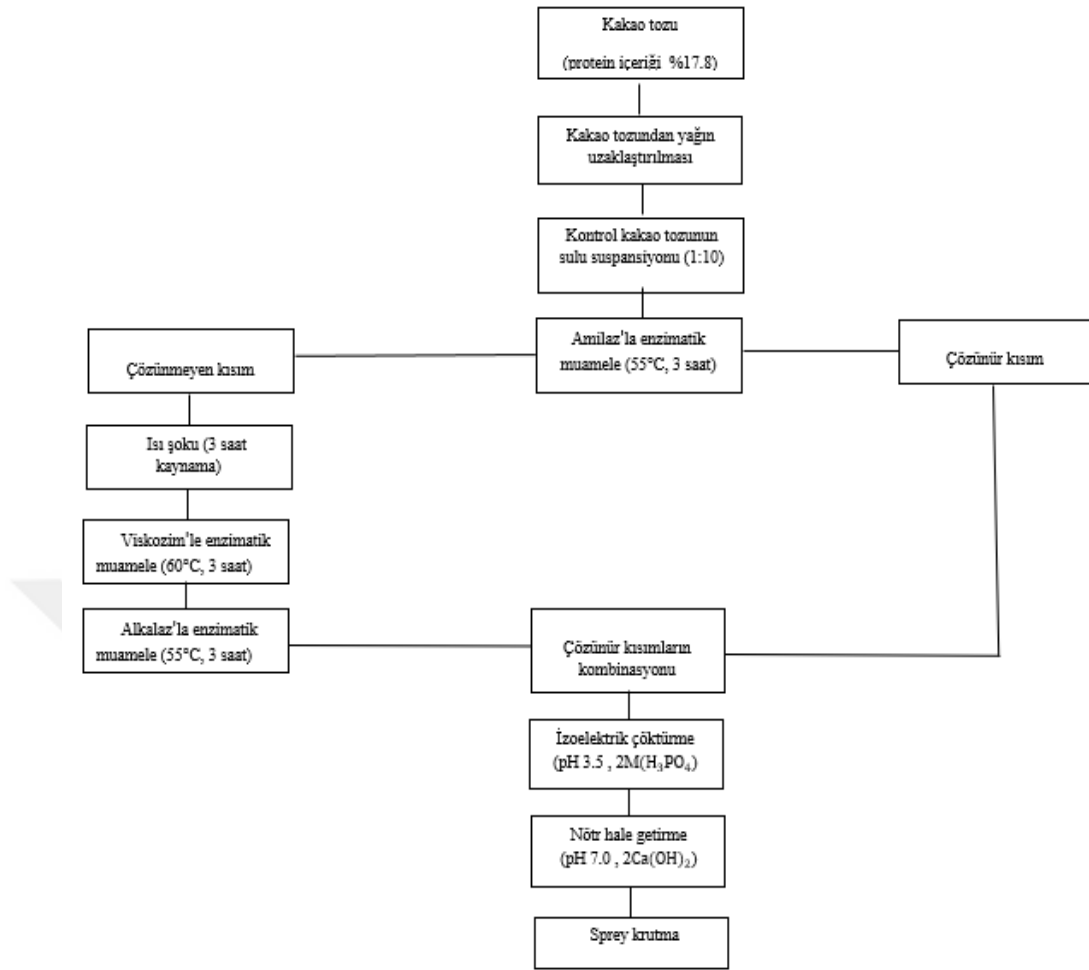
Düşük proteinli kakao tozunun üretim aşamaları Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. İlk olarak kakao tozunun yağını uzaklaştırmak amacıyla, kakao tozu hekzanla muamele edilmiş ve iki dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Oluşan karışım yarım saat boyunca çalkalamalı su banyosunda 25°C , 75 rpm'de çalkalanmıştır. Bu işlemin ardından tüpler 5 dakika, 25°C , 9000 rpm' de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen karışımın süpernatant kısmı alınarak tüplerdeki pellet kısmına aynı işlem iki kez

tekrarlanmıştır. Tekrarlanan işlemlerden sonra, en son tüpte kalan pellet 30°C'de etüvde bir gün boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Tam kuruyan topak halindeki kakao parçacıkları bir elek yardımıyla elenmiştir.

Oluşan yağsız kakao tozunun protein içeriğini azaltmak amacıyla, öncelikle kakaonun çözünürlüğü artırılmıştır. Bunun için Leclerc'in (2009) yaptığı çalışmadan yararlanılmıştır. Proteini azaltılmış kakao tozunu (PK) üretmek amacıyla kontrol kakao tozu (K) bir sıra işlemlerden geçirilmiş, son olarak püskürterek kurutmaya tabii tutulmuştur. Bunun için, ilk olarak kakaonun hasas tartımı yapılmış ve saf su eklenerek sıcaklık 55°C olacak şekilde bir saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Sulu kakao süspansiyonun pH'ı 2M fosforik asit (H_3PO_4) yardımıyla 7.5'den 6.0'ya getirilmiş ve 10 g Amilazla (AG 300 L, Novozymes) muamele edilmiştir. Bu karışım üç saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde 55°C 'de karıştırılmıştır. Amilaz AG 300 L enzimi, *Aspergillus Nijer* suşundan üretilen bir mantar glukoamilazdır. Nişastada 1.4-alfa bağlarının ve 1.6 alfa bağlarının hidrolizini katalize eden bir nişasta bozucu enzimdir (Kumar ve Duhan, 2011). Daha sonra, karışım 15 dakika, 25°C, 9000 rpm' de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen karışımın süpernatant kısmı alınarak bir kaptan toplanmış, tüplerdeki pellet kısmı ise bir gün boyunca -18°C'de buzlukta bekletilmiştir. Ertesi gün buzluktan çıkarılan donmuş pellete 100°C'deki saf su eklenerek ısı şok uygulanmıştır. Isıl şok uygulanan süspansiyon yarım saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve 30-40°C kadar soğutulduktan sonra, kondenser altında üç saatlik süre ile kaynatılmıştır. İşlem bittikten sonra karışım cam şişeye toplanarak bir gün boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ertesi gün karışımın sıcaklığı 60°C, pH:6.0 olacak şekilde ayarlanarak, 10 g Viskozim (≥ 100 fbgu / g, Novozymes) ile muamele edilmiştir. Viskozim, beta glukanaaz, hemiselüloz, arabinaz, ksilanaz, selüloz aktivitelerine sahip bir hücre duvarı bozucu multi enzim kompleksidir (Akin ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2009). Karışım 60°C üç saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üç saatin ardından karışımın sıcaklığı 55°C'ye düşürülerek 2M kalsiyum hidroksit $Ca(OH)_2$ yardımıyla pH:7.0'ye ayarlanmıştır.

Daha sonra, 10 g hassas tartımı yapılan çok yönlü endoproteaz olan Alkalaz (2.4 AU / g, Novozymes) eklenerek manyetik karıştırıcıda üç saat boyunca karıştırılmıştır. Alkalaz, *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen bir serin endopeptidazdır ve gıda endüstrisinde proteinleri hidrolize etmek, proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek ve farklı ürünler yapmak için kullanılır (Li ve ark., 2016a; Bhaskar ve ark., 2019; Tacias-Pascacio ve ark., 2020).

Üç saatlik sürenin sonunda, kakao süspansiyonun sıcaklığı enzimi inaktif etmek amacıyla 95°C 'ye çıkarılmış ardından oda sıcaklığında soğutulmuştur. Karışım 15 dakika, 25°C, 9000 rpm' de santrifüjlenerak süpernatant kısmı ayrılmış, ardından ilk enzim muamelesi sonucu toplanmış süpernatant ile birleştirilmiştir. Ardından bir gün bekletilen karışım 2M fosforik asit (H_3PO_4) yardımıyla pH:3.5'e düşürülmüştür Daha sonra santrifüjlenerak solüsyonun üst fazı alınmış ve 2M kalsiyum hidroksid $Ca(OH)_2$ yardımıyla pH:7.0'ye getirilmiş ve 20 dakika, 15°C, 9000 rpm'de iki kez art arda santrifüjlenerak. Oluşan kakao solüsyonunu kurutmak için püskürterek kurutma yöntemi uygulanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Proteini azaltılmış kakao tozunun üretim aşamaları.

3.2.3.1. Püskürterek kurutma

Kakao solüsyonunu kurutmak için Maltodekstrin (MD) kullanılmıştır. Kakao solüsyonunu 1: 1 (maltodekstrin: kakao çözeltisi) oranında sprej krutma için hazırlanmıştır. İlk olarak MD su içerisinde tamamen çözülmüş, daha sonra bu çözelti içerisinde kakao solüsyonunu ilave edilmiş, elde edilen çözelti 15 dakika karıştırılmıştır. MD, özellikle sprej tip krutucularda (spray dryer) krutmanın kolaylaşması, ürünün raf ömrünün uzatılması, aynı zamanda çözünürlüğün ve sıvı fazlarda emülsiyon yapma özelliğinin artırılması için kullanılmaktadır (Alexander ve Maltodextrins 1992). Sprej krutma için , mini bir sprej krutucu büchi B-290 (Büchilabortechnik AG, Flawil, İsviçre) kullanılmıştır. Püskürterek krutma için, cihaz sırasıyla besleme hızı 8.0 ml / dak, hava akış hızı 480 l / saat , set sıcaklığı 160°C ve

aspiratör debisi % 100 olarak programlanmıştır. MD'nin kakao çözeltisine ve diğer koşullara oranları önceden yapılan denemelerle belirlenmiştir. Püskürtülerek kuruyan karışım toz haline getirildikten sonra, PK hava geçirmez plastik torbalarda toplanmıştır.

3.2.4. Laboratuvar analizleri

3.2.4.1. Çözünürlük analizi

Suda çözünmeyen kuru madde miktarının belirlenmesi amacıyla örneklerin hassas terazide 2.5 g tartımı yapılmıştır. Numuneler iki ayrı 100 ml' lik bir balon jøjeye aktarılmış ve her biri 25 ml saf su ile tamamlanarak manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dakika süre ile karıştırılmıştır. Her iki numunenin filtre kağıdından geçirilmek suretiyle süzülmesi sağlanmıştır. Daha sonra filtre kağıdı üzerindeki kalıntılarla birlikte kurutma kaplarına alınarak 105°C'de 5 saat etüvde kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan numuneler desikatöre alınarak soğutulmuş ve hassas tartımı yapılmıştır. Numunelerin çözünürlük analizi, % suda çözünmeyen kuru madde miktarı hesaplanarak belirlenmiştir (Gamli, 2015).

$$\text{Suda çözünmeyen kuru madde miktarı (\%)} = \frac{(T2-T1) \times 100}{N}$$

N: numune ağırlığı, g

T2: filtre kağıdı + kalıntı miktarı, g

T1: filtre kağıdının darası, g

3.2.4.2. Şeker analizi

Şeker tayini için, Serpen ve Gökmen (2009) tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. Sprey kurutma öncesi elde edilen kakao 0.45 µm naylon filtrelerden geçirilerek, viallere doldurulmuş ve dolgu maddesinin çapı 5 µm, iç çapı 4.6 mm ve uzunluğu 250 mm olan HPLC kolonuna (GL sciences, Inertsil NH2, Tokyo, Japonya) enjekte edilmiştir. Analiz için, mobil faz olarak asetonitril:su (85:15) çözeltisi kullanılmış, kolon sıcaklığı 40°C, mobil fazın akış hızı 0,8 mL/dak ve enjeksiyon

hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. 0-1000 ppm aralığında glukoz ve fruktoz standart çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur ($R^2_{glukoz}=0,993$, $R^2_{fruktoz}=0,990$). Çikolata örnekler üç defa analiz edilmiş, ortalama değerler kullanılmış ve sonuçlar, kg kuru maddede g olarak ifade edilmiştir (Anese ve ark., 2009).

3.2.4.3. Protein analizi

Bu çalışmada, protein içeriğini belirlemek amacıyla, kjeldahl (keldal) yöntemi kullanılmıştır. Örneklerde organik bileşikler halinde bulunan azot katalizör eşliğinde derişik H_2SO_4 ile yaş yakma işlemi sonucunda indirgenerek amonyum azotu haline dönüştürülmüş, çözelti bazikleştirilmiş ve açığa çıkan NH_3 damıtılıp standart bir asit çözeltisinde toplanmış, titrasyonla miktarı belirlenmiştir.

İlk olarak örneklerin hassas tartımı yapılmış (1.0 ± 0.001 g), yakma tüpüne konulmuş, üzerine 1 adet katalizör tablet yakma tuzu (Merck) 20 mL ve H_2SO_4 eklenmiştir. Yakma tüpleri yakma setine konularak, 200-250°C arasında 15-20 dakika ön yakma yapılmış daha sonra 380°C derecede 30-45 dakika asıl yakma işlemine başlanılmıştır. Önce koyu renk olan çözeltide berrak renk oluştuktan sonra yakma işlemine 420°C’de 30 dakika daha devam edilmiştir. Yakma işlemi bittikten sonra tüpün yaklaşık 40°C’a kadar soğuması için 10-15 dakika beklenmiş ve 40 mL damıtık su vasıtasıyla tüpün iç yüzeyindeki kalıntılar yıkanarak temizlenmiştir.

Çalışmada, 500 ml’lik bir erlenmayere, distile su ile hazırlanmış % 4’lük H_3BO_3 çözeltisinden 50 mL kadar eklenmiştir. Ardından üzerine 4-5 damla İndikatör Çözeltisi (100mg /100 ml metilen kırmızısı ile 200 mg /100 ml metilen mavisi) ilave edilmiş ve damıtma cihazının soğutucusunun altına yerleştirilmiştir. Yakma tüpü cihazındaki yerine yerleştirilmiş, daha sonra üzerine saf su ile hazırlanmış %40’lık NaOH çözeltisinden 75 mL eklenerek damıtmaya başlanmıştır. Çalışmada, oluşan amonyum borat miktarı, 0,1 N H_2SO_4 çözeltisi ile titrasyon sonucu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, azot içeriği, kütlece yüzde olarak belirlenmiş, daha sonra 6,25 faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır (Cemeroğlu, 2010).

$$\% \text{Azot Miktarı (g/100g)} = \frac{V_1 - V_2 \times N \times 00.14}{\ddot{O}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\% \text{Protein Miktarı} = \% \text{Azot miktarı} \times 6.25 \quad (3.3)$$

$\ddot{O}$ = Örnek miktarı (g)

V_1 = Esas deneme için titrasyonda harcanan 0.1 N H_2SO_4 miktarı (mL)

V_2 = Şahit deneme için titrasyonda harcanan 0.1 N H_2SO_4 miktarı (mL)

N = Titrasyonda kullanılan H_2SO_4 çözeltisinin kesin normalitesi

3.2.4.4. Amino asit profil analizi

Her iki çikolata numunelerinin amino asit profillerinin tespitine yönelik amino asit konsantrasyon ölçümleri SÜBİTAM laboratuvarında, LCMS/MS sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz vasıtasıyla iki farklı kakao örneklerinin amino asit profilinin belirlenmesinde uygulanan yöntem, Bilgin ve ark. (2018) tarafından hamsi balığı eti için rapor edilen yöntemdir. Analiz için, beş farklı konsantrasyondaki standartları içeren kalibratör seti, kararlı izotop etiketli iç standart karışımı, mobil fazlar, reaktifler, kromatografik ayırım ve kütle dedeksiyon metod parametreleri ile, asidik hidroliz prosesinin dahil olduğu modifiye numune hazırlığının bulunduğu Jasem LC-MS/MS amino asit analiz kiti kullanılmıştır. Hedef amino asitlerin konsantrasyonu, elektrosprey iyonizasyonu (ESI), temelli çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak tespit edilmiştir. İlk aşamada çikolata örnekleri, hidroliz prosesi için, 0,5 g miktarında vida kapaklı cam bir tüpe alınmış ve üstüne 4ml reaktif 2 eklenerek 110°C'de 24 saat boyunca hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Hidrolizat oda sıcaklığına ulaştığında 4000 rpm'de 5 dakika içinde santrifüjlenmiştir. Ardından, 100 µl süpernatant bir vialle aktarılarak distile suyla 1ml'ye tamamlanmış ve bu seyreltme bir kez daha tekrarlanarak, numunenin 800 kat seyreltilmiş hidrolizatı elde edilmiştir. Daha sonra, hidroliz prosesini takiben kit numunesi hazırlanmıştır. Bunun için 50 µl seyreltilmiş hidrolizat numune vialine transfer edilmiş ve üzerine sırasıyla, 50 µl kararlı izotop etiketli iç standart karışımı ile 700 µl reaktif-1 ilave edilmiş ve karışım 5 saniye boyunca vortekslenmiştir. Hazırlanan tüm numuneler

yukarıda belirtilmiş prosedürler doğrultusunda LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.4.5. Antioksidan analizleri için örneklerin ekstraksiyonu

Çikolata örneklerinin antioksidan aktivite içeriği, DPPH radikal süpürme aktivitesi, demir iyonu indirgeme potansiyeli (FRAP) ve toplam fenolik madde (TFM) tayini yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivite analizlerinde örnek ekstraksiyonu için, Capanoğlu ve ark. (2008) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Analiz için, 2 KKÇ ve 4 gr PKÇ (1:1 Maltodekstrinle muamele edildiği için) deney tüplerine tartılmış, 3 ml %75'lik metanol çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda bekletilmiş, ardından 9000 rpm, 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üst kısımda toplanan süpernatant başka bir tüpe aktarılmış, kalan katı kısma yeniden 3 mL %75'lik metanol çözeltisi eklenmiş ve yöntem yeniden tekrarlanmıştır. Süpernatantların son hacimi 10 mL olacak şekilde üst fazlar birleştirilmiş ve analizlerde kullanmak üzere -18°C'de saklanmıştır.

3.2.4.6. DPPH radikal süpürme aktivitesi

Bu çalışmada, antioksidan aktivite deneylerinden biri olan, DPPH radikal süpürme aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır. Analiz için, hazırlanan ekstraktlardan 200 µL alınarak küçük deney tüpüne aktarılmış ve tüplerin içine 3 mL, 0,051 mM DPPH çözeltisi (%75 metanolde çözünmüş) eklenmiş ve vortex yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Daha sonra, oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiş, ardından küvetlere aktararak 517 nm'de absorbans değeri okunmuş ve sonuçlar 100 g kuru maddede troluks eşdeğeri cinsinden verilmiştir ($r^2=0,991$). Kontrol absorbansı için ise 200 µL %75'lik metanol çözeltisi kullanılmış ve cihazın sıfırlama işlemi %75'lik metanol çözeltisi ile yapılmıştır. Çalışmadaki çikolata örneklerinin DPPH radikalini süpürme etkisi ile belirlenen antioksidan aktivitesi, aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH giderme aktivitesi} = \frac{A_{(\text{kontrol})} - A_{(\text{örnek})}}{A_{(\text{kontrol})}} \quad (3.4)$$

$A_{(\text{kontrol})}$ = Kontrolün absorbens miktarı

$A_{(\text{örnek})}$ = Örnek absorbens miktarı

3.2.4.7. Demir iyonu indirgeme potansiyeli (FRAP)

FRAP analizi düşük pH'da, yani pH:3.5 'de Fe^{+3} iyonlarının Fe^{+2} iyonlarına indirgenmesi ile renkli ferrous-tripyridyltriazine kompleksi oluşturmaları ve oluşan demir tuzunun oksidan olarak kullanılması prensibine dayanmaktadır. Böylelikle, antioksidanların varlığında ferric-tripyridyltriazine ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$) bileşiği Fe^{+2} 'ye indirgenir. Neticede, $\text{Fe}^{+3} / \text{Fe}^{+2}$ redoks çifti redoks potansiyelinden daha düşük potansiyelli birçok komplekse Fe^{+3} 'ü indirgeyebilmektedir. Bu nedenle, sonuçlar yüksek çıkabilmektedir. Yöntem basit, hızlı ve maliyeti düşük olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Albayrak ve ark., 2010).

FRAP analizi için bu çalışmada, Benzie ve Strain, (1996) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. İlk önce, deneyde hazırlanan FRAP reaktifi için, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-Triazine), 20 mM FeCl_3 , 300 mM asetat tamponu (pH3,6) çözeltileri sırasıyla 1:1:10 oranında karıştırılarak reaktif oluşturulmuştur.

Hazırlanan ekstraktlardan deney tüplerine 100 μL alınmış ve üzerine FRAP reaktifinden 1,8 mL, distile sudan 1,2 mL ilave edilmiştir. Karışım 37°C 'de 15 dakika bekletilerek 593 nm'de absorbens ölçülmüştür. Standart grafiği ise, FeSO_4 'un farklı konsantrasyonları hazırlanarak oluşturulmuş, ortamda ne kadar Fe^{+3} 'un Fe^{+2} 'ye dönüştüğü tespit edilmiş ve sonuçlar 100 gr kuru madde üzerinden belirlenmiştir.

3.2.4.8. Toplam fenolik madde tayini (TFM)

Analiz için çalışmada, Singleton ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Öncelikle deney tüpü içerisine,

100 µL ekstrakt, ticari halde hazır bulunan 200 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 2 mL distile su eklenmiştir. İyice karıştırılmış ve 3 dakika bekletilmiştir. Ardından, %20 Na₂CO₃ çözeltisinden 1 mL eklenmiş ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Tüm absorbanslar süre sonunda 765 nm’de okunmuştur. Standart olarak gallik asit kullanılarak, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve örneklerin fenolik madde miktarı mg GAE/100 g kuru madde olarak verilmiştir.

3.2.5. Çikolata üretimi

Bu çalışmada hem kontrol grup (KKÇ), hem de, proteini azaltılmış gruptan (PKÇ) iki farklı çikolata üretimi gerçekleştirilmiştir. Çikolata örneklerinin hazırlanması için, sırasıyla %14 oranında kakao tozu, %45 oranında pudra şekeri ve %40 oranında kakao yağı kullanılmıştır. Bu ürünler PKU hastalarını dikkate alarak hazırlandığı için, süt yağı veya süt tozu gibi bileşenler eklenmemiştir. Codex Alimentarius (2003), verileri çikolatanın %14'ten az yağsız kakao katıları içermemesi gerektiğini belirttiği için, bu sebeple çalışmamızda hazırlanan çikolata tarifi buna göre ayarlanmıştır. Çikolata örneklerinin hazırlanması için iki farklı kakao tozunun, kakao yağının, pudra şekerinin, lesitinin hassas tartımı yapılmış ve çikolata üretiminde kullanılmıştır.

Öncelikle kakao yağının benmari yöntemiyle sıvılaştırılması yapılmış, ardından kakao tozu ilave edilerek bir mikser (Fakir-Mezza plus) ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım melangerde (Santha) öğütülmüştür. 6 saatlik inceltme işleminin ardından, lesitin ilave edilmiş ve 30 dakika daha karıştırılmıştır. Son olarak ise çikolata kitlesi 28°C'ye soğutulmuş, ardından 32°C'ye ısıtılmış ve tavlama işlemi tamamlanmıştır (Cerit vd., 2016). Tamamlanan işlemlerin ardından hazırladığımız çikolata kitlesi kalıplara dökülerek soğutulmuş ve numuneler analiz edilene kadar 4 °C'de soğutucuda saklanmıştır. Yağı uzaklaştırılmış kakao tozu ve düşük proteinli kakao tozu için de çikolata üretimi aynı şekilde yapılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. İki farklı kakao tozundan çikolata üretimi.

3.2.5.1. ikolatada renk analizi

Bu çalışmada hem yağı azaltılmış çikolata örneklerinin, hem de yağı ve proteini azaltılmış çikolata örneklerinin arasında karşılaştırma yapmak amacıyla Hunter Kolorimetresi kullanılmış ve L, a, b değerlerinin okunması prensibine dayalı renk analizi yapılmıştır. L değeri parlaklığı göstermekte olup L:0 siyah, L:100 beyaz, +a kırmızılık (- a yeşillik), +b sarılık (-b mavilik) değerlerini belirtmektedir (Rhim ve ark., 1999). Çikolata rnekler üç defa analiz edilmiş, ortalama değerler kullanılmış, sonuçlar ise kg kuru maddede g olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Analiz sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS (versiyon 11.5, SPSS Inc., ABD) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve düşük proteinli kakao tozu arasındaki farkı göstermek için T testi ($\alpha= 0.05$) uygulanmıştır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kakao Tozunda Şeker (Glikoz,Fruktoz) Kompozisyonu ve Çözünürlük Oranı

Bitkilerdeki hücre duvarı hücre zarının dış katmanında, mezofil kısmında bulunur ve lignoselülozik yapılıdır. Hücreyi dış etkilere karşı korur, cansızdır, esnekliği yok denecek kadar azdır ve hücrenin dayanıklılığını sağlamaktadır (Büyüklimanlı ve Atıcı 2015). Hücre duvarını oluşturan bu lignoselülozik yapılar başlıca üç polimerden oluşmuştur. Bunlar genellikle selüloz, hemiselüloz, lignindir. Aynı zamanda hücre duvarı nişasta, pektin, proteinler, çeşitli ekstraktlar veya reçineli materyalleri de içermektedir (Özyiğit 2002).

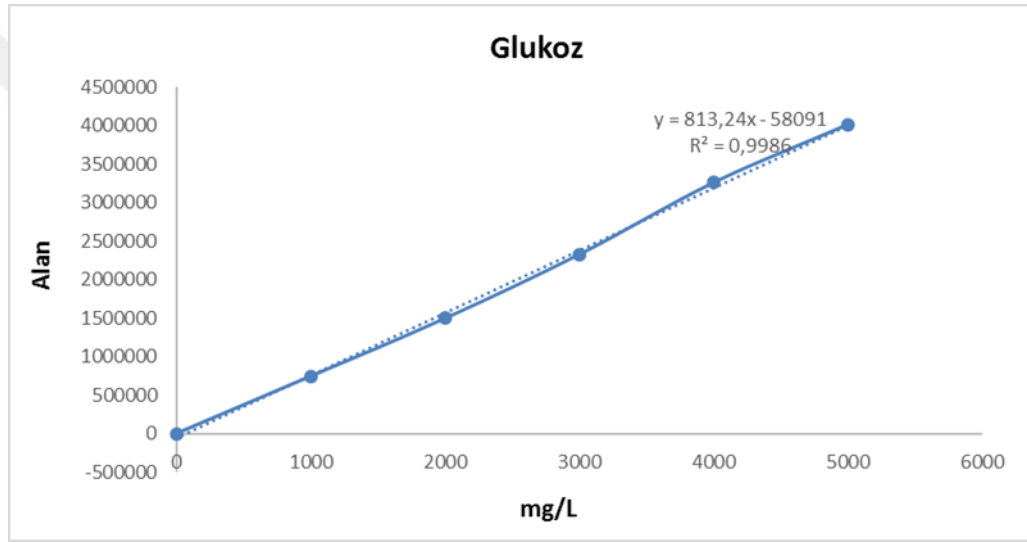
Kakao çekirdeklerinin yapısında mono-, oligo- ve polisakkaritler bulunmaktadır (Redgwell, 2003). Taze hasat edilmiş kakao çekirdeği yaklaşık yüzde 12-14 sindirilebilir karbonhidrat, önemli miktarlarda sindirilmeyen karbonhidrat ve lif içermektedir (Bucheli ve ark., 2001). Kakao çekirdeğindeki karbonhidratlarından olan nişasta çekirdek içeriğinin %3 ila %7 arasında değişen, başlıca sindirilebilir polisakkarittir (Redgwell, 2003). Nişasta, bitkilerde fazla miktarda bulunan, soğuk suda çözünmeyen bir depo polisakkarittir ve birbirine glikozidik bağlarla sıkı bağlanmış glikoz birimlerinden oluşmaktadır. Bu glikozidik bağlar yüksek pH'larda stabil olmakla beraber, çok düşük pH' larda hidroliz olabilmektedir (Maarel ve ark, 2002). Kakao çekirdeklerinin kabuk kısmı selüloz (%20.15), hemiselüloz (%21.06) ve lignin (%51.98) içermektedir (Wiharto, 2017). Selüloz, fermente/kurutulmuş kakao çekirdeklerinde yaklaşık %12'dir ve çeşitli derecelerde dallanmış heterojen bir ramnogalakturonan karışımından oluşan pektik polisakaritler ile birlikte hücre duvarı polisakkaritlerinin baskın bileşenlerinden biridir (Redgwell, 2003). Selülozun bitkilerdeki en önemli görevi hücre duvarı yapısında dayanıklılık sağlamaktır (Özyiğit,

2002). Doğada yaygın olarak bulunan selüloz sert, fibröz, suda çözülmeyen ve yapısındaki glukozlar (β 1→4) glukozidik bağla bağlanmış doğal bir polimerdir (Valenzuela ve ark., 2006). Selüloz, öncelikle hemiselüloz, lignin, pektin ve proteinlerin dahil olduğu diğer polimerlerin matriksine gömülmüş haldedir. Lignoselüloziklerdeki diğer karbonhidrat bileşeni, selüloz fibrilleriyle hidrojen bağları oluşturan, bitki dokusunun hücre duvarında selülozla birlikte bulunan, arabinoz, ksiloz, galaktoz, fukoz, mannoz, glikoz veya glukuronik asit ile ikame eden dallı bir glikoz veya ksiloz polimeri olan hemiselülozdur (Mosier ve ark., 2005). Hemiselüloz ve selüloz hidrojen köprüleri ile bağliken, hemiselüloz ve lignin arasında kovalent bağlar vardır (Sjöström, 1993). Ligninin kendisi bir karbonhidrat olmamasına karşın, doğada selüloz ve hemiselüloz ile beraber bulunduğundan karbonhidratlar arasında incelenmesine sıkça rastlanır. Temel yapı taşı fenil propan bileşiği olan sinapil ve koniferil alkollerdir. Lignin bir glikozit olup kolayca glikoz ve aromatik bir alkole ayrıştırılabilmektedir (Martinez, 2001).

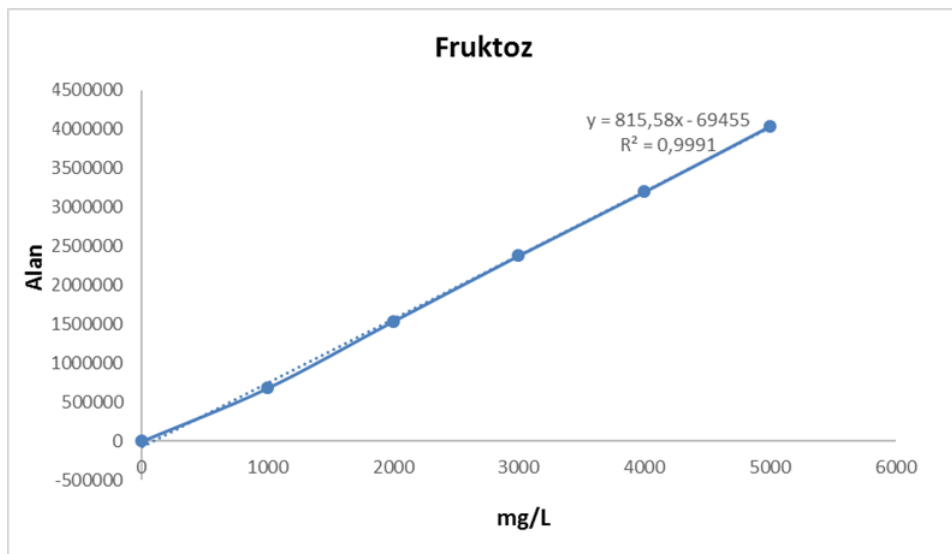
Fermente kakao çekirdeklerinde bulunan çözünür karbonhidratlar glikoz, sakaroz, rafinoz, fruktoz, staçinoz ve verbaskoz olup, %0.39 ile %3.48 arasında değişmektedir (Redgwell ve ark., 2003a). Başlıca şekerler ise glikoz, fruktoz ve sakarozdur. Bu şekerlerin değişken konsantrasyonları, muhtemelen kakao çekirdeklerini belirgin şekilde etkileyen farklı fermantasyon koşullarından kaynaklanmaktadır. Kakao çekirdeklerinin fermantasyonu sırasında meydana gelen sükroz hidrolizi, kavurma işlemi sırasında aroma oluşumu için önemli olan indirgen şekerleri sağlamaktadır. Fermantasyon, aroma öncülerinin oluşumu için gerekli olsa da, çikolatanın tipik aroması, kakao çekirdeklerinin kavurma işlemine kadar gelişmez. Kavurma işlemi sırasında oluşan enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu (Maillard reaksiyonu) indirgen şekerlerin neredeyse tamamı uçucu bileşiklerin oluşumunda yer aldıkları için, yok olmaktadır. Aksine, indirgeyici olmayan şekerler, yani sakaroz, rafinoz, staçinoz ve verbaskoz Maillard reaksiyonuna giremedikleri için konsantrasyonlarında herhangi bir azalma olmaz (Bertazzo ve ark., 2012).

Kakao çekirdeklerinin işlenmesi sonucu oluşan kakao tozu, yüksek yağ içeriği ve çok sayıda polisakarit bazlı karbonil grubu nedeniyle düşük çözünürlüğe sahiptir

(Omobuwajo ve ark., 2000). Bu sebeple de bu çalışmada, yağı uzaklaştırılmış kakao tozunun çözünürlüğü ısı ve enzim işlemleri ile artırılmış, ardından izoelektrik çökeltme ile protein seviyesi düşürülmüştür. Çalışmanın materyal ve metot kısmındaki yöntemde gösterildiği gibi, ilk kullanılan enzim olan Amilaz nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalamaktadır. Amilaz, kakaonun hücre duvarının sıkı yapısındaki glikozidik bağlarını parçalayarak, nişasta polisakkaritini glikoz üniteleri içeren daha küçük polimerlere hidroliz etmektedir (Wim, 2006). İki farklı kakao örneğinin glukoz ve fruktoz miktarları HPLC yardımıyla refraktif indeks dedektörü kullanılarak belirlenmiş ve standart eğrileri (glukoz ve fruktoz) Şekil 4.1. ve 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Glukoz analizi için oluşturulan standart eğri.



Şekil 4.2. Fruktoz analizi için oluşturulan standart eğri.

Bu yöntemle uygulanan işlemler sonucunda kakao tozunun işlem öncesi ve sonrası indirgen şeker içerikleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

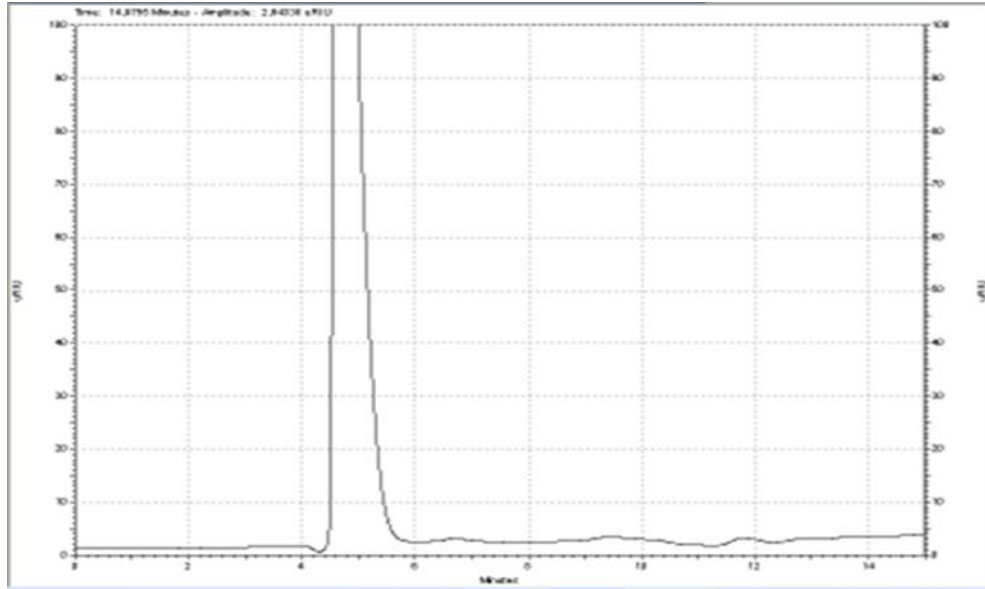
Tablo 4.1. Kakao tozunun şeker (glikoz, fruktoz) değerleri.

Örnekler	Glikoz (g/100 g)	Fruktoz (g/100 g)
Kontrol kakao tozu	TE	TE
Düşük proteinli kakao tozu	21.34±1.21*	1.14±0.30*

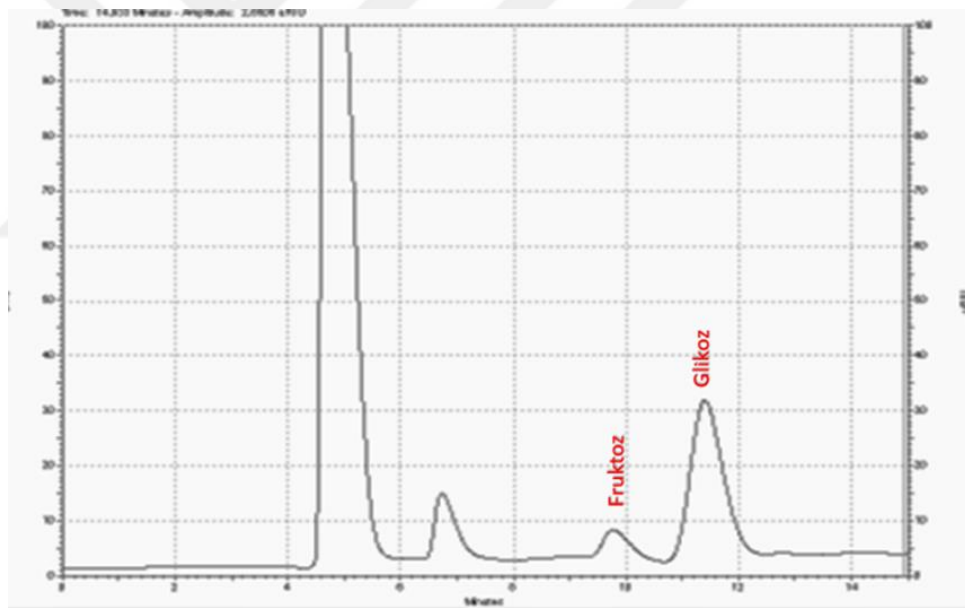
* kontrol ve düşük proteinli kakao numuneleri arasındaki önemli farkı gösterir ($p<0.05$). TE tespit edilemediğini gösterir.

Araştırmada kullanılan, 100g kakao tozunun etiket bilgisinde yazan şeker oranı 0.4 g olarak gösterilmiştir. Ancak çalışmada, HPLC-RID dedektörü ile kontrol grup kakao tozunda çözünür şeker tespit edilmemiştir. Buna rağmen, 100 g düşük proteinli kakao tozunda glikoz ve fruktoz miktarı sırasıyla 21.34 g ve 1.14 g/100g olduğu tespit edilmiştir. Kakao çekirdeklerinde, fermentasyon sırasında enzimatik reaksiyonlar nedeniyle indirgen şeker artarken, kurutma ve kavurma işlemlerinden sonra azalır. Bu nedenle, kontrol kakao örneğinde indirgeyici şeker tespit edilememiş, ancak enzimatik işlemlerden sonra belirlenmiştir. Ayrıca, işleme sırasında pH düşüşü nedeniyle, sükrozun glikoz ve fruktoza hidrolizinin indirgen şeker konsantrasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (Redgwell ve diğerleri, 2003; Afoakwa ve diğerleri, 2013).

İki farklı kakao örneğinin şeker içeriğine ait kromatogram görüntüsü Şekil 4.3. ve 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol kakao tozu örneklerinin şeker içeriğine ait kromatogram görüntüsü



Şekil 4.4. Düşük proteinli kakao tozu örneklerinin şeker içeriğine ait kromatogram görüntüsü

Delgado ve ark. (2008) yapılan benzer bir çalışmada, kahve ekstratlarından ve çözeltilerinden fraksiyonlar hazırlanarak, bu fraksiyonların çözünmeyen kısımlarının şeker içeriği belirlenmiştir. Kahve özünden ve tortudan izole edilen çözünmeyen fraksiyonların hidrolizi için selülaazlar, hemiselülaazlar, pektinazlar ve proteaz içeren on iki ticari enzim kullanılmıştır. Kahve galaktomannanların ve arabinogalaktanların esas yapı taşlarını oluşturan galaktoz, mannoz ve arabinoz içermektedir. Kullanılan

enzimlerden Pektinaz 444L, bu substratlardan başta mannoz ve galaktoz olmak üzere her iki çözünmeyen fraksiyonlarda şekerlerin salınmasında en etkili enzim olduğu belirlenmiş ve hidroliz sonucu mannoz içeriğinin % 44 arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmayla özün çözünmeyen kısmının tortunun çözünmeyen fraksiyonlarından daha yüksek şeker konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir.

Genellikle kakao tozunun içeriğinin %75'i suda çözünmezken, sadece %25 lik kısmı yararlı çözünür bileşenlerden oluşmaktadır (Blackburn, 2009). İyi bir çözünürlük için, bazı durumlarda tek bir enzimin kullanılması iyi bir verim sağlayabilse de, en iyi strateji, hücre duvarlarının farklı bileşenlerine etki ede bilen birkaç enzim karışımlarından oluşan kompleks enzim kullanmaktır (Chen ve ark., 2016; Hu ve ark., 2019). Yapılan araştırmalara göre, hatta basit bileşikler hidrolize etmek için bile birkaç enzimin kullanılması avantajlı olabilmektedir (Arana-Peña ve ark., 2020). Ancak karmaşık bir matri ele alındığında, enzim kompleksi kullanımının belirgin avantajlara sahip olduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2016; Hu ve diğerleri, 2019). Enzim kompleksleri, çok geniş sıcaklık değerlerini (0-100°C) ve pH (2-14) aralığındaki reaksiyonları katalizleyebilmektedirler (Smith, 2004). Bu enzim komplekslerinin, bir çok çalışmada sulu enzimatik ekstraksiyonu günümüzde oldukça fazla ilgi görmektedir (Passos ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2010; Latif ve Anwar, 2011; Gai ve ark., 2013; Li ve ark., 2016; Liu ve ark., 2019; Naik ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2012).

Bu sebeple, çalışmada nişasta bozucu Amilaz enziminin ardından kullanılan ısı şoku işlemi hücre duvarlarının sıkı yapısını daha da gevşetilebilmiştir. Gevşetilmiş hücre duvarına, içeriği ksilanaz, arabanaz, β -glukanaz, hemiselüloz ve selülaz aktiviteleri içeren enzim kompleksi olan Viskozimle etki edilmiştir (Nolasco-Arroyo ve ark., 2019). Viskozim, çok bileşenli bir karbohidrazdır ve bitki hücre duvarı polisakaritini etkili bir şekilde hidrolize edebilmektedir. Viskozim, polisakarit matrisi içindeki bağların parçalanmasında ve böylelikle protein gibi hücre içi bileşenlerin serbest bırakılmasında avantaj sağlayabilmektedir (Anon, 1991).

Yönteme göre uygulanan işlemler sonucunda kakaonun hücre çeperini tahrip edilmesi ile çözünürlük %28.61'den %50.69'a yükselmiştir. Kakao tozunun uygulanan işlemler öncesi ve sonrası çözünürlük değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Kakao tozunun çözünürlük değerleri.

Örnekler	Çözünürlük (%)
Kontrol kakao tozu	28.61±0.08
Düşük proteinli kakao tozu	50.69±0.07*

* kontrol ve düşük proteinli kakao numuneleri arasındaki önemli farkı gösterir ($p<0.05$).

Bu araştırmaya benzer başka bir çalışmada (Blackburn, 2009), üç farklı yöntem geliştirilerek kakao tozunun çözünürlüğü arttırılmıştır. Birinci yöntemde sulu bir kakao süspansiyonu hazırlanmış, süspansiyon indirgeyici enzimle muamele edilmiş (nişasta parçalayıcı enzim), kullanılan enzimin uygun pH ve sıcaklıkla 2 saat süreyle muamele edilmiş, 2 saat sonunda ilk aşamadaki pH'ya tekrar getirilmiştir. Ardından hemisüllaz veya proteaz gibi hücre duvarı parçalayıcı, protein bozucu indirgeyici enzimlerden biri ile muamele edilmiş, elde edilen süspansiyon çözünür kısım ve çözünmeyen kısım olarak ayırma işlemine tabii tutulmuş, çözünür kısımdan çözünür kakao bileşenleri elde edilmiştir. İkinci yöntemle kakao tozu izotonik konsantrasyonu altında bir tuz ihtiva eden çözeltiyle karıştırılarak hazırlanmış (burada söz konusu kakao tozunun damıtılmış su veya iki kez damıtılmış su ile karıştırılarak hazırlanmasıdır). Ardından süspansiyon bir veya birden daha fazla indirgeyen enzimle muamele edilmiş (amilazlar, polifenolaz, selüloz, glukanaaz, peptinaz, proteazlar, pentosanazlar), ultrasonik işleminden sonra çözünmeyen ve çözünür kısımlarına ayrılmıştır. Ayırma işlemi, filtrasyon, dekantasyon, santrifüjleme veya bunların kombinasyonu şeklinde uygulanmıştır. Çözünmeyen kısım önce dondurulmuş, ardından donmuş malzeme sıcak su solüsyonu ile temasıda ısıtılmayla yeni bir süspansiyon elde edilmiştir. Tuzdan arındırma işlemi yapılarak çözünür kısım ve çözünmeyen kısma ayrılmıştır (isteğe bağlı olarak verimi arttırmak için, bir veya daha fazla bozundurucu enzimle muamele edilebilir). Üçüncü yöntemde ise, kaka tozunun sulu süspansiyonu hazırlanmış, süspansiyona 2 saat süreyle uygun bir pH da sıcaklık ve basınç uygulanarak enzimatik muameleye tabii tutulmuş, işlem bittikten sonra ilk aşamadaki pH ya tekrar getirilmiştir. İşlenmiş süspansiyon çözünür kısım ve

çözünmeyen kısım olarak ayırma işlemine tabii tutulmuş, çözünmeyen kısım dondurulmuş, donmuş kısımlara ısı şoku uygulanmıştır. İşlenmiş süspansiyon isteğe bağlı enzimatik muamele edilmiş, çözünmeyen kısım ve tuzdan arındırma işlemi yapılarak, çözünür kakao bileşeni elde edilmiştir. Bu üç yöntemlerle uygulanan işlemler sonucunda, genel olarak kakao tozunda en az %50 oranında çözünürlük sağladığını belirtilmiştir. Ayrıca nişastanın %14.5'inin ve selülozun %22.5'inin çözünürlüğü etkileyen glikoz, dekstrin ve glikoz oligomerlerine dönüştüğü bildirilmiştir.

4.2. Kakao Tozunun Protein İçeriği

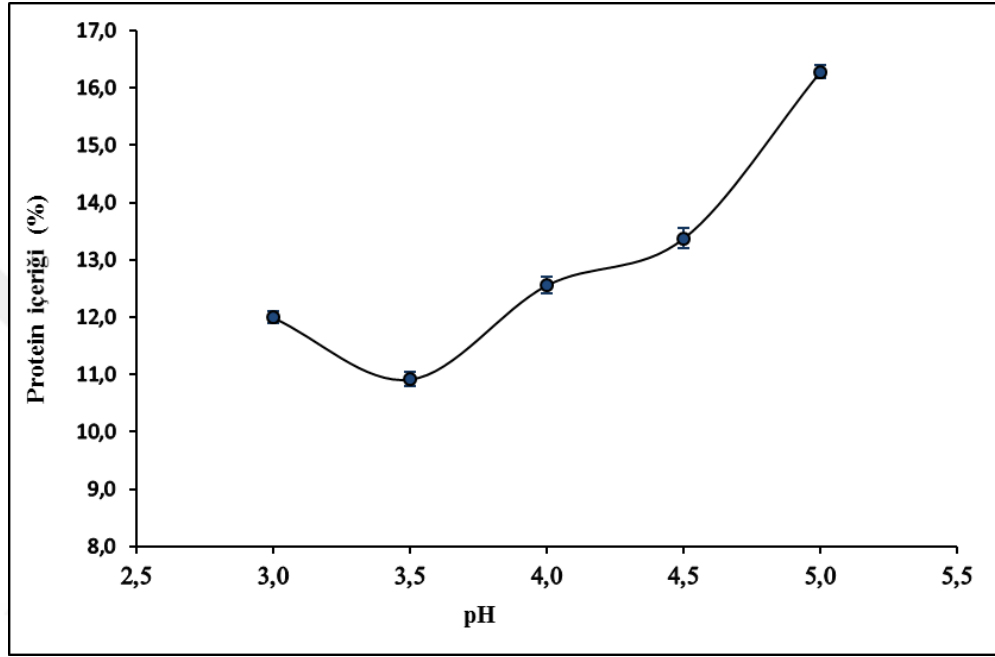
Proteinler genellikle hücrelerin iç yapısındaki protein gövdelerinde (aleuron tabakasında) bulunur. Aleuron tabakası, endospermin en dıştaki tabakasıdır, aleuron taneleri içerir ve bu tabakayı iç nişastalı endosperm izler. Kalın birincil hücre duvarları, aleuron hücrelerini çevreler ve korur. Aleuron tabakası hem gelişen tohum hem de olgun bitki için önemlidir. Aleuron dokusu, tohum gelişimi sırasında yararlı olan büyük miktarlarda yağ ve lipit biriktirir, aynı zamanda bir mineral depolama alanıdır. Ek olarak, aleuron dokusu, protein gövdeleri olarak bilinen birçok protein depolayan vakuol içerir (Taiz ve Zeiger 2002; Becraft ve Yi, 2011). Bu sebeple, proteinlerin salınması hücre bozulmasına bağlıdır (Marathe ve ark., 2017). Bitkilerdeki sıkı hücre duvarının varlığı, hücre proteinlerinin salınmasında bir bariyer görevi üstlenmektedir (Nadar ve ark., 2018). Hücre parçalanması, proteinlerin hücre yapısından ayrılması etkinliğini artırmak için önemli adımlardan biridir (Prabakaran ve Ravindran, 2011) ve uygulanan işlemlerin proteinleri denatüre etmemesine dikkat edilerek çeşitli kimyasal yöntemlerle veya sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (Nadar vd., 2018). Yüksek sıcaklık (>50 °C), organik çözücüler, kuvvetli asit veya bazik çözeltilerin kullanımı protein çözünürlüğünü azaltarak protein salınımı verimini düşürebilmektedir (Wilken ve Nikolov, 2016). Diğer yandan, enzimatik yöntemler, çevre dostu ekstraksiyon teknolojilerine duyulan ihtiyaç nedeniyle bitki dokularından protein eldesinde umut vadetmektedir (Puri ve ark., 2012). Protein salınım sisteminin çalışma prensibi, hücre içi bileşenlerin serbest bırakılması için bitki hücre duvarının bir katalizör enzim yardımıyla hidroliz edilerek

bozulmasına dayanmaktadır. İşlem sırasında bitki hücre duvarı enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzimin şekil değiştirmesine ve substrat-enzim arasında maksimum etkileşim sağlanmasına sebebiyet vermektedir. Bu tip değişiklikler, substrat üzerinde hidrolitik reaksiyonlara neden olarak hücre duvarının bağlarının kırılmasına neden olmakta ve aktif bileşenlerin dışarı salınmasını kolaylaştırmaktadır (Sheldon ve van Pelt., 2013). Enzimatik yöntem, hammaddenin sıkı ve kompleks yapısını parçalayabilmesi, istenmeyen bileşenleri seçici olarak uzaklaştırabilmesi, salınım süresini kısaltması ve yüksek katalitik verimlilik göstermesinin yanında, sürdürülebilir bir sistemdir (Puri ve ark., 2012 ; Marathe ve ark., 2017). Enzimatik yöntem sonucu, elde edilen ürünlerin kalite özellikleri korunmuş durumdadır ve insan tüketimi için daha uygundur (Ochoa-Rivas ve ark., 2017).

Proteinlerin çözelti içerisindeki çözünürlüğü, yapısındaki amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik grupların dağılımına bağlı olmakla birlikte sıcaklık, pH değeri, iyonik kuvvet ve tuz konsantrasyonu gibi faktörler ile değişmektedir. Aynı zamanda, çözünürlüğü etkileyen bu faktörler kullanılarak izoelektrik noktaya bağlı protein çöktürme yöntemi de uygulanmaktadır (Bonner, 2007). Gıdalarda kullanılan izoelektrik çöktürme yöntemi, büyük ölçekte üretim kolaylığı ve yüksek oranda verim sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2017). Proteinlerin, asidik ortamda baz gibi, bazik ortamda asit gibi davranma özellikleri vardır. Proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değeri, o proteinin izoelektrik noktası (pI) olarak tanımlanmaktadır. İzoelektrik noktada artı ve eksi yükler eşit olması nedeniyle benzer moleküller arasında elektrostatik itmeler yerine çekmeler oluşması proteinlerin çökmesine neden olur (Novak ve Havli, 2016). Genel olarak izoelektrik çöktürme yönteminde, hammadde belirli bir orandaki çözücüde karıştırılır. Daha sonra, oluşan karışımın pH değeri alkali olarak ayarlanır, belirli bir süre ve sıcaklıkta protein ekstraksiyonu sağlanır. Bir sonraki aşamada ise karışımın pH değeri izoelektrik noktasına getirilerek proteinler çöktürülür ve santrifüj işlemi ile proteinler elde edilir (Boye ve ark., 2010).

Proteinlerin yapıları sıcaklık ve pH'daki değişimler ile bozulabilmektedir (Aehle, 2004). Bu sebeple bu çalışmada, kakao süspansiyonuna 3.0;3.5;4.0;4.5;5.0;5.5 pH'ları uyguladıktan sonra protein analizi yapılmıştır. Ön çalışmalarda, çözeltinin pH'nın 3.5'e

ayarlandığında proteinlerin çökertilmesinin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle proteinler pH 3.5'te H_3PO_4 çözeltisi ile çöktürülmüştür. Şekil 4.5.'de gösterildiği gibi, en iyi sonuç yağı uzaklaştırılmış 100 g kakao tozu için pH 3.5'de protein içeriğinde %38.61 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Protein içeriğindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Kakao tozunun protein içeriği.

Her enzim maksimum aktivite gösterebilmek için optimum pH ve sıcaklığa gereksinim duymaktadır. Bu sebeple, bir enzimin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa duyarlıdır (Aehle, 2004). Genellikle proteinlerin enzimatik hidrolizi, alkalaz, pepsin, pankreatin, bromelain, fisin vb. gibi proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (Meng ve ark., 2020; Fedimu ve ark, 2022; Gong ve ark., 2022). Bu enzimler, proteinlerin spesifik bölgesini bulur, peptit bağlarını parçalar ve farklı biyoaktiviteye sahip peptitleri serbest bırakır. Böylece sınırlı ve kontrollü hidroliz derecesi değeri elde edilir (Liu ve ark., 2021; Ghelich ve ark., 2022).

Bu çalışmada kullanılan Alkalaz enzimi, serin tipi endoproteaz sınıfına ait olan *Bacillus licheni-formis*'ten üretilen bir ham proteazdır (Meinlschmidt ve ark., 2016).

Alkalaz, bozulmuş hücre duvarından salınan protein yapısını geniş ölçüde hidrolize ederek, proteini iç kısımdan ayıran endopeptitazdır (Tacias-Pascacio ve ark., 2020).

Bu araştırmada materyla olarak kullanılan Barry Callebaut marka kakao tozunun protein içeriği etiket kısmında 18-19 g /100 g olarak gösterilmiştir. Yaptığımız protein analizi sonucunda, kontrol grup kakao tozunun protein içeriği 17.8 g /100 g olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç etiket bilgisi ile paralelik göstermektedir. Uygulanan yöntemlerle işlem yapılmış, yani protein oranı düşürülmüş kakao tozunun protein oranı ise 10.9 g /100 g olduğu belirlenmiştir. Kakao süspansiyonunun uygulanan işlemlerden sonra protein oranındaki % azalma değerleri Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Kakao süspansiyonunun protein oranındaki % azalma

Kakao süspansiyonunun pH'sı	Protein oranındaki % azalma
3.0	32.55
3.5	38.61
4.0	29.80
4.5	24.80
5.0	8.48

4.3. Kakao Tozunun Amino Asit (AA) İçeriği

Doğuştan metabolizma hataları olarak da adlandırılan kalıtsal metabolik bozukluklar (IMD'ler), metabolik kusurlarının neden olduğu, metabolit birikimi ve temel maddelerin eksikliği ile ilişkili bir hastalık türüdür (Ferreira ve van Karnebeek, 2019). Bugüne kadar 3.000'den fazla IMD türü belirlenmiştir (Mak ve ark., 2013). Klasik doğuştan gelen metabolizma hataları, protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezi ya da katabolizması yolağında, bir enzim ya da kofaktörünün eksikliği ya da substrat taşıyıcı protein eksikliği sonucunda ortaya çıkan kalıtsal tek gen bozukluklarıdır. İlk kez 1908'de kalıtsal metabolik hastalıklar Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanmıştır (Garrod, 1908). Kalıtsal metabolik hastalıkları Araştırma Derneği

(SSIEM) tarafından sistematik olarak metabolik hastalıklar, AA ve peptit metabolizması bozuklukları, karbonhidrat metabolizması bozuklukları, yağ asidi ve keton metabolizması bozuklukları, enerji metabolizması bozuklukları, pürin, pirimidin ve nükleotit metabolizması bozuklukları, sterol metabolizması bozuklukları, porfirin ve hem metabolizması bozuklukları, lipid ve lipoprotein metabolizması bozuklukları, konjenital glikolizasyon bozuklukları ve diğer protein modifikasyon bozuklukları, lizozomal hastalıklar, nörotransmitter metabolizması bozuklukları, vitaminler ve kofaktörlerin metabolizmasındaki bozukluklar, eser elementlerin ve metallerin metabolizmasındaki bozukluklar, ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki bozuklukları şeklinde sınıflandırılmaktadır (Ezgu, 2017).

AA metobolizma bozuklukları arasında, PKU, tirozinemi, akçaagaç şurubu hastalığı (MSUD), homosistinüri, alkaptonüri, sistinüri gibi hastalıklar yer almaktadır. AA metobolizma bozukluklarının klinik semptomları, genellikle toksik ara maddelerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (Zschoche, 2010). Doğumsal metabolizma hastalıklarından olan, PKU, homosistinüri, tirozinemi gibi akut kriz riski oluşturmeyen protein metabolizması bozukluklarından farklı olarak, MSUD ve organik asidemilerde tıbbi beslenme tedavisine uyulmadıkta metabolik kriz atakları nedeniyle hastane yatışları sık görülen metabolizma bozukluklarıdır (Handoom ve ark.,2018).

PKU, fenilalanin hidroksilaz eksikliği sonucu oluşan, kanda ve beyinde yüksek konsantrasyonlarda Phe ve düşük Tyr'e yol açan metabolik bir bozukluktur (Jahja ve ark., 2014). Phe'nin AA dengesizliği, biyoenerjetik eksiklik veya oksidatif stres gibi patofizyolojik mekanizmalar yoluyla nörolojik ve nöropsikiyatrik rahatsızlıklara sebep olduğu rapor edilmiştir. Düşük Tyr konsantrasyonu, beyinde nörotransmitterlerin tükenmesine neden olan işlev bozukluğundan sorumludur (Schuck ve ark., 2015; Zerjav Tansek ve ark., 2015). Bir çok ülkede hastalar için yaşam boyu belirli bir Phe kısıtlı diyeti önerilmektedir, ancak önerilen bu diyet yetişkinler veya gençler tarafından sıklıkla yarıda kesilmektedir (Rocha ve ark., 2013). PKU hastalarının diyetinde fenilalanin AA'i ya düşük bir miktarda bulunabilir ya da hiç bulunmaması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada düşük protenli kakao örneklerinin AA kompozisyonu belirlemek önem arz etmektedir.

İki farklı kakao örneğinde, esansiyel ve esansiyel olmayan toplam 19 adet AA tespit edilmiştir. Esansiyel AA histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin ve valine, esansiyel olmayan AA'leri ise arjinin, alanin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glisin, ornitin, prolin, serin, tirozin ve taurin oluşturur. İki farklı kakao örneklerine dair AA değerleri Tablo 4.4.' de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kakao tozu örneklerinin amino asit değerleri.

Amino asit	Kontrol kakao tozu (g/kg)	Düşük proteinli kakao tozu (g/kg)	Azalma (%)
Alanin	3.69±0.01	1.98±0.02*	46.17
Arjinin	11.58±0.01	7.08±0.03*	38.85
Aspartik Asit	19.00±0.02	11.34±0.04*	40.34
Sistein	TE	TE	TE
Glutamik Asit	42.78±0.02	28.64±0.08*	33.06
Glisin	TE	TE	TE
Histidin	5.46±0.01	5.71±0.01	TE
Izolösin	1.53±0.17	0.85±0.01*	44.73
Lösin	10.54±0.92	4.89±0.05*	53.64
Lizin	2.36±0.09	0.62±0.02*	73.65
Metiyonin	1.50±0.01	TE*	100.00
Ornitin	12.68±0.01	11.35±0.02*	10.49
Fenilalanin	11.63±0.07	9.87±0.15*	15.12
Prolin	18.91±0.29	15.47±0.04*	18.18
Serin	21.27±0.02	15.07±0.05*	29.16
Treonin	17.04±0.04	15.09±0.01*	11.45
Tirozin	5.30±0.47	5.19±0.35	2.05
Valin	14.28±0.02	13.07±0.01*	8.48
Taurin	TE	TE	TE

* kontrol ve düşük proteinli kakao numuneleri arasındaki önemli farkı gösterir (p<0.05), TE tespit edilemediğini gösterir.

Sonuçlara göre, kontrol grup kakao örneklerinde fenilalanin oranı 11.63 g/kg iken, düşük proteinli kakao örneklerinde bu oran uygulanan işlemlerden sonra 9.87 g/kg olduğu belirlenmiştir ve fenilalanin oranının %15.12 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Fenilalanin hariç diğer esansiyel AA analiz sonuçlarını gözden geçirirsek, düşük proteinli kakaonun AA profili incelendiğinde, histidin ve tirozin dışındaki AA konsantrasyonlarında önemli azalmalar elde edilmiştir (p<0.05). AA konsantrasyonlarındaki azalma oranları metiyonin, lizin, lösin, alanin ve izolösin için

sırasıyla %100,00, %73,65, %53,64, %46,17 ve %44,73 olmuştur. Bu AA'lerden izolösin, lösin ve valin oranındaki azalma AA'ler açısından yaşam boyu diyet kısıtlamalarına uyması gereken MSUD hastaları için oldukça önemlidir (Akçaağaç şurubu idrar hastalığı; MSUD) alfa-ketoasit dehidrogenaz enzim kompleksindeki eksiklik sebebiyle dallı zincirli esansiyel AA'ler olan lösin, izolösin, valinin idrarda ve plazmada birikip, artış göstermesi ile karakterize olan bir hastalıktır. MSUD hastaları da aynı PKU hastaları gibi AA'lerce fakir olan gıdalarla beslenmelidir (MacDonald ve ark., 2007).

Ayrıca metiyonin oranındaki %100 azalmanın tespit edilmesi, Homosistinüri hastaları için de, alternatif bir ürün geliştirildiğini göstergesidir. Homosistinüri otozomal resesif geçiş gösteren, homosistein sülfürlü bir aminoasit olan, metiyonin metabolizmasında rol oynayan enzim ya da enzimlerin eksikliğinden kaynaklanan ve birden çok sistemik bozuklukla seyreden, metabolik bir hastalıktır (Teng ve ark., 2002). Bu bulgular sonucunda düşük proteinli kakao tozunun metabolik bozukluğu olan hastaların diyetlerinde alternatif olarak kullanılabileceği ürünlerden biri olduğu söylenebilir.

Tablo 4.5.'de kontrol grup numuneler arasında en konsantre amino asit değeriyle Glutamik asit 42.78 g/kg ilk sırada olduğu ve Serinin 21.27 g/kg değeri ile ikinci sırada yer aldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda hem kontrol numunelerde, hemde düşük proteinli kakao numunelerinde sistin, glisin ve taurin tespit edilememiştir. Adeyeye ve ark. (2010) tarafından aynı çiflikte yetiştirilmiş fermente ve fermente edilmemiş kakao çekirdeklerinin amino asit profili incelenmiş, sırasıyla glutamik asit ve sistinin oranının kakao çekirdeklerinde en bol ve en az oranda olduğunu bildirmiştir. Valterney ve ark. (2021) kakao çekirdeklerinin 120 günlük fermantasyon sürecinde amino asit profilini incelemiş ve baskın amino asitin glutamik asit olduğu fermantasyon öncesi 86.3 mg/g, 120 günlük fermantasyon sonrası 203 mg/g. Glisin oranının en az olduğunu, fermantasyon öncesi 5.20 mg/g, fermantasyon sonrası 7.07 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

4.4. Kakao Tozunun Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Madde İçeriği

Kakaonun belirgin bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu ve 1400'ün üzerinde kakao çeşidinin var olduğu belirtilmiş, bu nedenlerle, bir çok çalışmada kakao ve ürünlerinin antioksidan kapasitesine ilişkin net bir sayı verilmemiştir (Cornert ve Merdol., 2018). Özellikle, kakao polifenolleri, mamül ürün çikolatanın rengi ve lezzeti açısından son derece önemli bileşenlerdir. Kakao ve çikolatanın flavonoid polifenol profilini, flavanoller (kateşinleri), flavonoller, flavonlar, flavanonlar, analog flavonidler ve antosiyanin flavonoidleri oluşturmaktadır (Tokuşoğlu, 2015). Kakao çekirdeklerinden elde edilen polifenoller, çeşitli araştırmalarda antioksidan özelliklere sahip biyoaktif bileşenler olarak rapor edilmiştir (Oracz ve Nebesny, 2016). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar kakaonun yüksek konsantrasyonlardaki polifenol içerdiğinin sağlık üzerinde olumlu etkilerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Sağlığa yararları ile ilgili olarak, polifenol bakımından zengin kakao ve ürünlerinin kilo veya glisemik kontrolü etkilemeden HDL seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Mellor ve ark., 2010). Bu polifenoller kardiyovasküler hastalıkları hafifletmede, insülin direnci, endotel fonksiyonunu güçlendirmede ve trombosit agregasyonunu inhibe etmede rol oynamaktadır (Cooper ve ark., 2007). Kakao çekirdeklerinde, antikolesterolemik, antidiyabetik, hipotansif, vücutta yağ yakımını hızlandıran, bağırsak kasılmasını artıran, tümör oluşumunu engelleyen (kansere önleyici), bronşiyal astımı önleyen, düzgün beyin işleyişini iyileştiren ve hafıza kaybını (amnezi veya alzheimer) önleyen faydalı fitokimyasallar vardır. Ayrıca insanlarda kesik veya yaraların iyileşmesini kolaylaştırabilen glutamin, arginin ve lösin gibi faydalı amino asitler içermektedir (Etaware, 2021).

Kakao çekirdeklerinin ve türev ürünlerinin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır örneğin; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik), (ABTS), ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC) ve Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) gibi (Cádiz-Gurrea ve ark., 2014; Batista v ark., 2016).

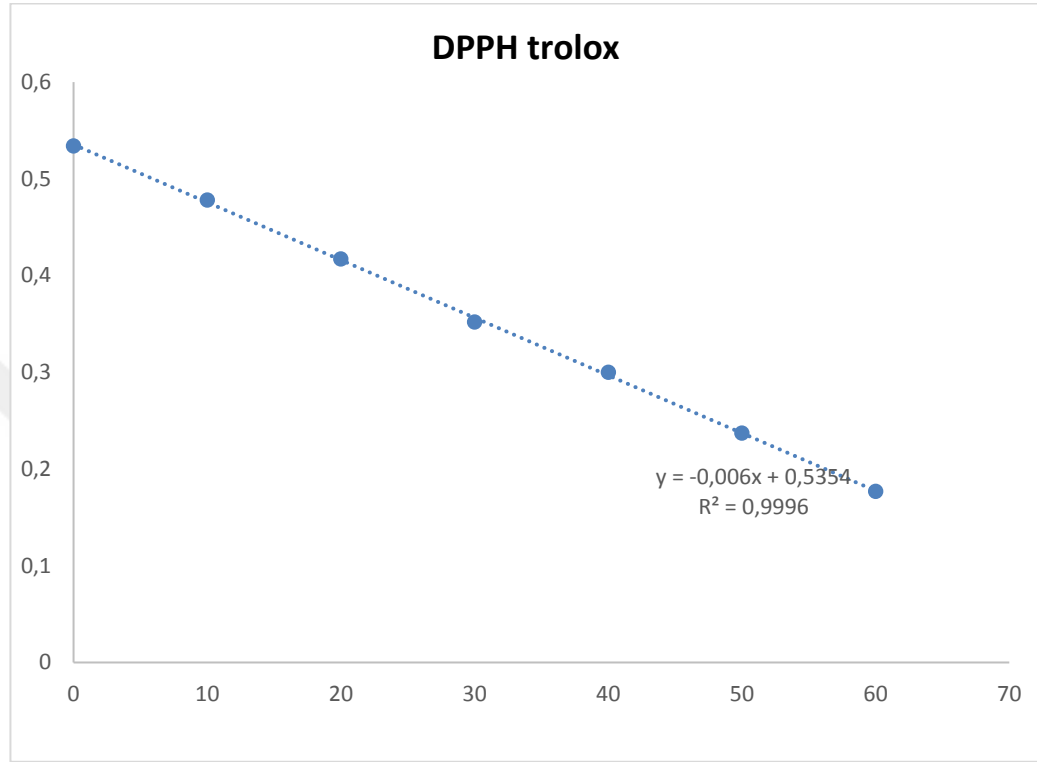
Ayrıca çikolata üretiminde olduğu gibi, gıdalarda uygulanan ısıl işlemin derecesine bağlı olarak pro-oksidan ve antioksidan moleküller oluşabilmektedir. Böylelikle, ısıl işlem sırasında gıdada doğal olarak bulunan antioksidanların yıkıma uğrayabileceği ve antioksidan aktiviteye sahip yeni bileşenlerin oluşabileceği ifade edilmektedir. Bir çok farklı gıdalarda uygulanan ısıl işlemin derecesi ve süresi antioksidan özellikleri değiştirebilmektedir (Calligaris ve ark., 2004). Isı muamelesi zamanı, gıdanın depolama stabilitesi, duyuşal, besinsel özellikleri gibi kalite özelliklerini değiştiren bir takım kompleks olaylar meydana gelmektedir. Ancak bazen uygulanan ısıl işlem sırasında, ısıya duyarlı fenolik bileşikler gibi bazı biyoaktif bileşenlerin yıkımı nedeniyle gıdanın besin değerinin önemli oranda azalmakta ve ısıl işlem görmüş gıdanın sağlık üzerine olumlu etkisinin ısıl işlem görmemiş ham gıdaya göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (Choi ve ark., 2006). Bazense, gıdanın yapısı ve bileşimi, uygulanan ısıl işlemin türü ve sıcaklık derecesi ile fenolik bileşenlerin miktarında hiç bir değişiklik yaratmamakta ya da miktarda artışa sebep olabilmektedir (Sakac ve ark., 2011).

Bu çalışmada PKU hastalarının gıda takviyesine katkıda bulunmak amacıyla, ham kakao tozuna uygulanan işlemler (çözünürlüğün artırılması, ısıl işlem, protein uzaklaştırılması) sonucu iki farklı kakao örneklerinin oluşumunda, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite (DPPH radikal süpürme aktivitesi, FRAP) yöntemi kullanılmıştır.

4.4.1. DPPH radikal süpürme aktivitesi

Bu yöntem, DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanmaktadır (Brand Williams ve ark., 1995). Yöntemin avantajı, DPPH reaktifinin en zayıf antioksidanlar da dahil olmak üzere karışımdaki tüm maddelerle etkileşebilmesi ve hem lipofilik, hem de hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesidir (Kedare ve Singh, 2011).

Yapılan bu çalışmada, DPPH radikal süpürme aktivitesini hesaplamada, troloks standart eğrisi kullanılmıştır (Şekil 4.6.). İki farklı kakao örneklerinin, DPPH radikal giderme aktivitesindeki değişimi Tablo 4.5.'de verilmiştir ($R^2 = 0.9996$).



Şekil 4.6. DPPH analizi için oluşturulan standart eğri

Örneklerin Tablo 4.5. verilen sonuçlarına göre, 1. saat sonunda DPPH radikal süpürme aktivitesi, kontrol grup kakao örneklerinde 22.37 mg troloks/100 g olurken düşük proteinli kakao örneklerinde 22.70 mg troloks/100 g değeri belirlenmiştir. Uygulanan işlemler kakaonun DPPH radikal süpürme aktivitesinde kayıp meydana getirmemiş, aksine 0.33 oranında hafif bir artım meydana getirmiştir. Böylelikle, sonuçlar karşılaştırıldığında örnekler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). İşlem sonucunda antioksidan aktivitede herhangi bir önemli değişikliğin olmaması, bu çalışma için olumlu bir sonuçtur.

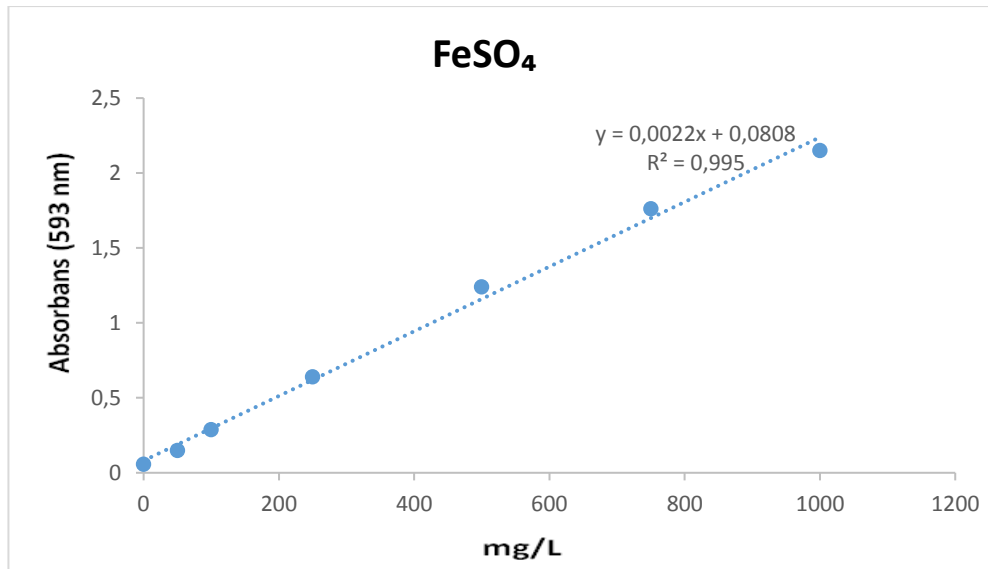
Tablo 4.5. Kakao örneklerinin DPPH değerleri.

Örneklek	DPPH değerleri (mg troloks/100 g)
Kontrol kakao tozu	22.37±0.25
Düşük proteinli kakao tozu	22.70±0.17

4.4.2. Demir iyonu indirgeme potansiyeli (FRAP)

FRAP yöntemi demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda yani düşük pH değerinde (pH 3.5), Fe(III)- TPTZ kompleksinin Fe(II) formuna indirgenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur. FRAP yönteminin en önemli avantajı, basitliği, hızı (hızlı reaksiyon veren polifenoller 4 dakika gibi kısa analiz zamanlarında tayin ediliyor), ucuzluğu ve sağlamlığıdır. Özel bir ekipman gerektirmeyen, otomatik, yarı-otomatik ve manuel metotlarla gerçekleştirilebilen yöntemdir (Büyüktuncel, 2013).

Örneklerinin FRAP değerleri belirlenirken farklı konsantrasyonlarda FeSO₄ çözeltisi kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu çalışmada, FRAP yöntemine ait standart eğrisi Şekil 4.7.'da verilmiştir ($R^2 = 0.995$).



Şekil 4.7. FRAP analizi için oluşturulan standart eğri.

Tablo 4.6.'da görüldüğü gibi çikolata örneklerinin FRAP değerleri mg FeSO₄/100 g km olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. İki farklı kakao örneğinin FRAP değerleri

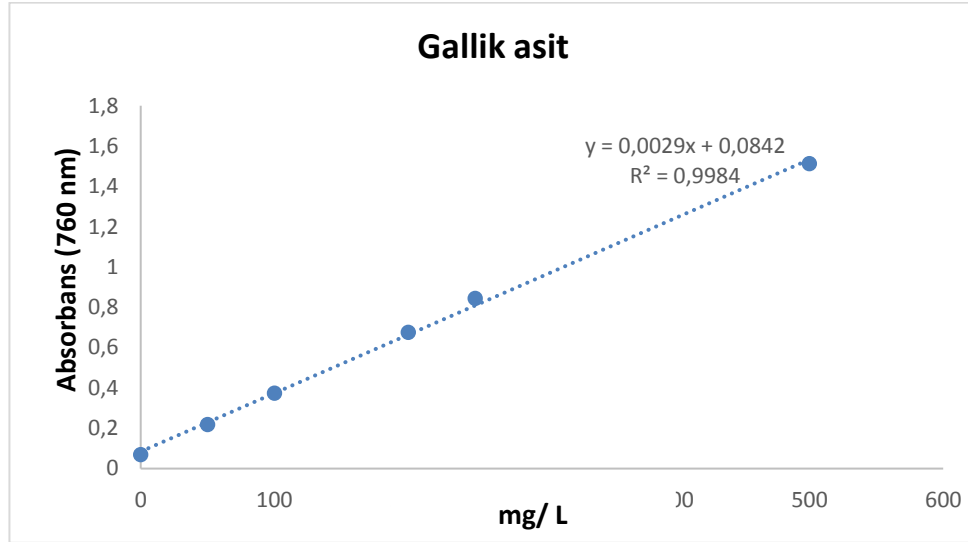
Örnekler	FRAP değerleri (mg FeSO ₄ /100 g)
Kontrol kakao tozu	222.14 ± 1.88
Düşük proteinli kakao tozu	224.12 ± 0.77

Kontrol grup kakao örnekleri ile karşılaştırıldığında, düşük proteinli kakao örneklerinin FRAP değerlerinde kontrol kakao örneklerine kıyasla 1.98 oranında çok hafif bir artış meydana gelmiştir. Bu durum istatistik olarak, örnekler arasında anlamlı bir farklılık olmadığına göstergesidir ($p>0.05$). İşlem sonucunda antioksidan aktivitede herhangi bir önemli değişikliliğin olmaması, bu çalışma için olumlu bir sonuçtur.

4.4.3. Toplam fenolik madde tayini

Çikolata kakaosunun %72.32'lik fenolik madde içeriğini, % 5.89 epikateşinler, % 3.93 prosiyanidin B₂ oluşturmaktadır (Natsume ve ark., 2008). Gıdaların içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir ve genellikle toplam fenol içeriği ile antioksidan aktivitesi arasında oldukça iyi doğrusal bir korelasyon görülmektedir (Prior ve ark., 2005).

Bu çalışmada çikolata örneklerinin fenolik içeriği, pigmentler, karbonhidratlar ve Maillard reaksiyon ürünleri gibi diğer indirgeyici bileşiklerle reaksiyona giren Folin-Ciocalteu reaktifi ile ölçülmüştür. Gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak, çikolata örneklerinin toplam fenolik madde miktarı mg GAE/100 g km olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Gallik asit analizi için oluşturulan standart eğrisi.

Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. İki farklı kakao örneklerinin TFM değerleri.

Örnekler	TFM değerleri (mg GAE/100 g)
Kontrol kakao	15.82±0.76
Düşük proteinli kakao	25.10±1.44*

* kontrol ve düşük proteinli kakao numuneleri arasındaki önemli farkı gösterir (p<0.05).

Kontrol örneğinin toplam fenolik madde miktarı 15.82 mg GAE/100g olarak belirlenirken, düşük proteinli kakaoda 25.10 mg GAE/100g GAE olmuştur. Protein oranı uzaklaştırılmış kakao örneklerinde kontrol gruba kıyasla toplam fenolik değerlerinde 9.28 oranında artış meydana gelmiştir. Bu durum istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0,05). Düşük proteinli kakaonun toplam fenolik madde değeri, kontrol numunesine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeninin işlem sırasında uygulanan ısıtma işlemi ve enzimler olabileceği düşünülmektedir. Düşük proteinli kakao tozunda indirgeyici şeker içeriği arttığından, melanoidin oluşumu toplam fenolik madde miktarında artışı sağlayabilmektedir (Arlorio ve ark., 2008; Coghe ve ark., 2006; Ioannone ve ark., 2015).

Çünkü, antioksidan aktivitede meydana gelen artışı, antioksidan aktiviteyi engelleyen oksidatif enzimlerin ısıl işlem ile inaktivasyonu, ısıl işlemin ve uygulanan enzimlerin hücre duvarını bozması, çözünmez formdaki fenolik bileşenlerin serbest hale geçmesi, yeni antioksidan bileşiklerin oluşması şeklinde tanımlamak mümkündür (Pinelo ve ark., 2005). Bununla birlikte 200° C'nin üstündeki sıcaklıkların fenolik bileşiklere zarar verdiği de vurgulanmaktadır (Kim ve ark., 2006). Elde edilen bu verilerden, doğal bileşenlerde bulunan bazı gallat türevlerinin ısı etkisiyle gallik asite dönüştüğü ve gallik asit miktarındaki artışa katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Velioğlu, 2006).

Gültekin-Özgüven ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada kakao tozunun toplam fenolik madde içeriğinin 18,0 mg kateşin eşdeğeri/g olarak bildirmiştir. Başka bir çalışmada, alkalize olmayan ve alkalize kakao tozları arasında polifenol içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite açısından fark olup olmadığına bakılmış ve toplam fenolik madde miktarının doğal kakao tozunda 41.55 mg GAE/100g'dan, alkalize kakao tozunda 10.67 mg GAE/100g'a kadar değiştiği belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları bizim bulgularımıza paraleldir (Todorovic ve ark., 2017).

4.5. Çikolata Örneklerinin Renk Değerleri

Renk, gıda endüstrisinde hammadde ile işlenmiş nihai gıda ürünlerinin özellikleri, kalitesi hakkında fikir veren ve tüketici tercihlerinde önemli bir yere sahip kalite parametrelerinden biridir (Velioğlu, 1987). Tüketici için gıdanın optik görünümü oldukça önemlidir. Gıda yüzeyinin rengi, tüketiciler tarafından değerlendirilen ilk kalite parametresidir ve gıda ürününün kabulü için kritik öneme sahiptir. Çoğu zaman yüzey rengiyle belirlenen gıdaların görünümü, tüketicinin gıdayı rahatlıkla tüketmesi veya tüketmemesi için bir araç olarak algıladığı ve kullandığı ilk duyumdur (Leon ve ark., 2006). Çikolata örneklerinin renk değerleri L^* , a^* ve b^* Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Çikolata örneklerinin renk değerleri

Örnekler	L*	a*	b*
Kontrol çikolata	40.28±0.37	2.29±0.11	-4.92±0.14
Düşük proteinli çikolata	49.86±0.75	12.90±0.19	4.28±0.22

* kontrol ve düşük proteinli kakao numuneleri arasındaki önemli farkı gösterir ($p<0.05$).

Çikolata örneklerinin renk değerleri karşılaştırıldığında, önemli fark olduğu görülmüştür. Elde edilen verilere göre, kontrol grup çikolatalara kıyasla düşük proteinli çikolatalarda L* değeri oldukça yüksektir. Bu durum düşük proteinli çikolatanın kontrol grup çikolataya kıyasla daha açık ve parlak olduğunun göstergesidir. Çikolata örneklerinin kırmızılık değeri a* incelendiğinde, maltodekstrin ilavesinin kakao tozunun rengin açılması kırmızılık değerlerinde artıma neden olduğu sonucuna varılmıştır. Maltodekstrin beyaz renkli bir madde olduğu için kakao tozunun karakteristik rengini açması doğaldır. Sadece kontrol grup çikolatalarda b* oranı negatiftir. Bu ise kontrol grup çikolatanın koyu kahve renginin göstermektedir, yani düşük proteinli çikolata kontrol çikolataya göre daha yüksek sarılık değerine sahiptir.

Bu çalışmada kurutma işleminde verimi artırmak için kullanılan kurutmaya yardımcı madde Maltodekstrinin eklenmesinin çikolata örneklerinin renk değerlerini istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır. Tablo 4.5.'de verilen analiz sonuçlarına göre, protein içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamaların L*, a*, b* değerleri üzerine istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bu tezin ön çalışmalarında, 1:2 oranında maltodekstrin konsantrasyonu (maltodekstrin: kakao çözeltisinin kuru maddesi) denenmiştir. Ancak, düşük proteinli kakao tozunda bulunan yüksek şeker miktarının, aglomerasyona neden olan su molekülleri ile güçlü bir şekilde etkileşime girdiği görülmüştür. Bu nedenle çalışmada, sprey kurutma için 1:1(maltodekstrin: kakao çözeltisinin kuru maddesi) maltodekstrin konsantrasyonu kullanılmış ve bu da çikolata örneklerinde, daha açık bir renkle sonuçlanmıştır. Benzer bir çalışmada Ribeiro ve ark. (2020), kakao tozunda sprey ve dondurarak kurutma ile kakao tozunun akış özellikleri üzerine maltodekstrin ilavesinin etkisini değerlendirmiş ve numunelerinde %15 ve %30 (m m-1)

maltodekstrin kullanılmıştır. Kakao tozundaki maltodekstrin konsantrasyonu ne kadar yüksekse, spre y kurutma ile aglomere edilen ürünün o kadar düşük olduğunu bildirmişlerdir.



BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, yüksek protein içeriğine sahip popüler bir gıda olan kakaonun, protein içeriğini düşürerek PKU hastalarının tüketebileceği ürünlerden biri haline getirilmesi planlanmıştır. Bunun için, düşük proteinli kakao üretiminin ilk adımı olarak, ısı ve enzimatik işlemlerle kakao tozunun çözünürlüğünü artırılmıştır. Daha sonra Amilaz ve Viskozim enzimleri sırasıyla nişasta ve hücre duvarı yıkımı için kullanılmıştır. Kakao tozundaki proteinleri daha da parçalamak için bir sonraki aşama olarak Alkalaz enzimi eklenmiş ve ardından izoelektrik çökeltme ile protein seviyesi düşürülmüştür. İşlemlerden sonra, kakao konsantre sıvısı püskürtülerek kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Kontrol kakao tozu ve düşük proteinli kakao tozu olacak şekilde iki farklı kakao tozu üretimi gerçekleştirilmiştir. Her iki kakao tozunun öncelikle % indirgen şeker, çözünürlük, protein ve amino asit oranı belirlenmiştir. Daha sonra kakao örneklerinin antioksidan aktivite (DPPH, FRAP) ve toplam fenolik madde miktarları tespit edilmiştir. Yöntem sonrası iki farklı kakao tozundan iki farklı çikolata örnekleri hazırlanmış ve çikolata örneklerinin renk değerleri karşılaştırılmıştır.

Araştırma sonunda elde edilen verilere göre;

- Şeker sonuçlarına göre, kontrol kakao tozu örneklerinde (şeker içeriği ürün etiketinde 0.4 g/100 g olarak belirtilmiştir) indirgen şeker tespit edilmemiştir. Ancak 100 g düşük proteinli kakao tozu başına glikoz ve fruktoz miktarı 21.34 g ve 1.14 g olarak bulunmuştur. Ham kakao çekirdeğinin başlıca şekerleri glikoz, fruktoz ve sakarozdur. Kakao çekirdeklerinin fermentasyonu sırasında enzimatik reaksiyonlar nedeniyle indirgen şeker miktarı artarken, kurutma ve kavurma işlemlerinden sonra bu miktar azalmaktadır. Bu sebeple, kontrol kakao örneğinde indirgeyici şeker tespit edilememiş, ancak enzimatik

işlemlerden sonra belirlenmiştir. Ayrıca, işleme sırasında pH düşüşü nedeniyle, sükrozun glikoz ve fruktoza hidroliz de indirgen şeker konsantrasyonunu artırabildiği düşünülmüştür.

- Çözünürlük değerlerine göre, çalışmanın yöntem kısmındaki ilk kullanılan enzim olan Amilaz nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalamış, ardından kullanılan ısı şoku işlemi hücre duvarlarının sıkı yapısını daha da gevşetilebilmiştir. Gevşetilmiş hücre duvarına, içeriği ksilanaz, arabanaz, β -glukanaz, hemiselüloz ve selüloz aktiviteleri içeren enzim kompleksi olan Viskozimle muamele edilmiştir. Viskozim, çok bileşenli bir karbohidrazdır ve bitki hücre duvarı polisakaritini etkili bir şekilde hidrolize edebilmektedir. Böylelikle uygulanan işlemler sonucunda kakaonun hücre çeperini tahrip edilmesiyle, kakao tozunun çözünürlüğü, %28.61'den %50.69'a yükselmiştir.
- Protein analizi sonuçlarına göre, işlem yapılmamış kontrol grup kakao tozunun protein içeriğinin 17.8 g/100g olduğu bildirilmiştir. pH 3.5'e ayarlandığında proteinlerin çökertilmesinin en yüksek olduğunu belirlenmiş ve H_3PO_4 çözeltisi ile izoelektrik çöktürülerek işlem yapıldıktan sonra düşük proteinli kakao tozunun protein oranı 10.9 g /100 g olduğu tanımlanmıştır. 100 g kakao tozu için en iyi sonuç, pH 3.5'de protein içeriğinde %38.61 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu da, kontrol örneğine göre protein içeriğinin neredeyse %40 oranında azaldığını göstermektedir.
- Amino asit sonuçlarına göre, kontrol grup kakao örneklerinde fenilalanin oranı 11.63 g/kg iken, düşük proteinli kakaoda ise bu oran uygulanan işlemlerden sonra 9.87 g/kg olduğu belirlenmiştir ve böylelikle fenilalanin oranının %15.12 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Diğer amino asit değerleri kontrol edildiğinde histidin ve tirozin dışındaki tüm amino asit oranlarında azalmalar görülmüştür. Bu amino asitlerden izolösin, lösin ve valin oranındaki azalma yaşam boyu diyet kısıtlamalarına uyması gereken MSUD hastaları için, metiyonin oranındaki %100 azalma ise Homosistinüri hastaları için alternatif bir ürün geliştirildiğinin göstermiştir.
- Kakao örneklerinin Antioksidan Aktivite kapasitesinin belirlenmesinde DPPH radikal süpürme aktivitesi ve FRAP yöntemi denenmiştir. DPPH radikal süpürme aktivitesi, kontrol grup kakao örneklerinde 22.37 mg troloks/100 g'

ken, düşük proteinli kakao örneklerinde 22.70 mg troluks/100 g olduğu belirlenmiştir. Uygulanan işlemler kakaonun DPPH radikal süpürme aktivitesinde kayıp meydana getirmemiş, aksine 0.33 oranında hafif bir artım oluşturmuştur. FRAP değerleri kontrol kakao örneklerinde 222.14 mg FeSO₄/100 g, düşük proteinli kakao örneklerinde 224.12 mg FeSO₄/100 g olduğu belirlenmiştir. Düşük proteinli kakao örneklerinin FRAP değerlerinde kontrol kakao örneklerine kıyasla 1.98 oranında çok hafif bir artış meydana gelmiştir. Böylelikle, hem DPPH radikal süpürme aktivitesinin hem de FRAP analizinin sonuçları karşılaştırıldığında örnekler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür.

- Kakao örneklerinin Toplam fenolik madde değerleri inceleğinde, kontrol kakao örneğinin toplam fenolik madde miktarı 15.82 mg GAE/100g, düşük proteinli kakaoda 25.10 mg GAE/100g GAE olduğu tespit edilmiştir. Protein oranı uzaklaştırılmış kakao örneklerinde kontrol gruba kıyasla toplam fenolik değerlerinde 9.28 oranında artım meydana gelmiştir. Bu durum istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Düşük proteinli kakaonun toplam fenolik madde değeri, kontrol numunesine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeninin işlem sırasında uygulanan ısı işlem ve enzimler olabileceği düşünülmektedir.
- Çikolata örneklerinin renk analizi sonuçlarına göre, kontrol grup çikolata örneklerine kıyasla düşük proteinli çikolatalarda L* değeri oldukça yüksektir. Bu durum düşük proteinli çikolatanın kontrol grup çikolataya kıyasla daha açık ve parlak olduğunun göstergesidir. Çikolata örneklerinin kırmızılık değeri a* incelendiğinde, maltodekstrin ilavesinin kakao tozunun rengin açılması kırmızılık değerlerinde artıma neden olduğu sonucuna varılmıştır. Maltodekstrin beyaz renkli bir madde olduğu için kakao tozunun karakteristik renginin açılması doğaldır. Sadece kontrol grup çikolatalarda b* oranı negatiftir. Bu ise kontrol grup çikolatanın koyu kahve renginin göstermektedir. Yani düşük proteinli çikolata kontrol çikolataya göre daha yüksek sarılık değerine sahiptir. Bu çalışmada kurutma işleminde verimi artırmak için kullanılan kurutmaya yardımcı madde maltodekstrinin eklenmesinin çikolata

örneklerinin renk değerlerini istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Özetle, analiz sonuçlarının tümü değerlendirildiğinde uygulanan pH değerleri, ısıtma işlemi, Amilaz, Viskozim, Alkalaz enzimleriyle muamele ve izolektirik çöktürme kakao tozunun çözünürlüğünü artırmıştır. Kontrol kakao tozu örneklerinde şeker belirlenmemesine rağmen, çözünürlüğü artmış düşük proteinli kakao tozunda indirgen şekerlerden glikoz ve fruktoz belirlenmiştir. Kontrol örneğine kıyasla, düşük proteinli kakao tozunun protein içeriğinin neredeyse %40 azaldığını göstermiştir. Ayrıca düşük proteinli kakao tozunun amino asit profilinde histidin ve tirozin dışında önemli azalmalar elde edilmiştir. Düşük proteinli kakaonun toplam fenolik içeriği daha yüksek iken, antioksidan aktiviteleri değişmemiştir. Son olarak elde edilen kakao örnekleri çikolata üretimi için başarıyla kullanılmıştır. Maltodekstrinle muamele edilmesi düşük proteinli çikolata örneklerinin renk değerlerinde açılmaya sebep olmuştur.

Bu çalışmayla yapılmış çözünürlüğü artırılmış kakao tozu, gıda sektöründe kullanımı kakao tozunun verimini artırarak daha çok kakao tozu işlenmesine yardımcı olacaktır. Aynı zamanda bu kakao tozundan hazırlanacak ürünler market raflarında yer alırsa amino asit bozukluğu olan hastalar için düşük proteinli gıdaların çeşitliliğini artırabilir. Gelecekteki diğer çalışmalarda, kakao tozunun protein içeriğini verimli bir şekilde azaltmak için ultrafiltrasyon veya aktif karbon gibi farklı yöntemler araştırılabilir. Elde edilen kakao örnekleri çikolata üretimi için başarıyla kullanılmıştır, bu nedenle dondurma, kurabiye, bisküvi, kakaolu içecekler, fındık kreması gibi çeşitli gıda ürünlerinde uygulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- A. Blau N., de Groot M.J, Hoeksma M., Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. (2010) Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab.* 99 (Suppl 1):S86–S89.
- Adeyeye E., Akinyeye R., Ogunlade I., Olaofe O., Boluwade J., (2010) Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans *Food Chem.*, 118 (2) , pp. 357-363. (erişim tarihi: 25.02.2012).
- Aehle W., (2004). *Enzymes in Industry Production and Application*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, p.484.
- Afoakwa E.O., Paterson A., Fowler M., Ryan A., (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review, *Food Science and Nutrition*, 48 (9), pp. 840-857. (erişim tarihi: 01.02.2008).
- Afoakwa E.O., Quao J., Budu A.S., Takrama J., Saalia F.K., (2012). Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp preconditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans *Int. Food Res. J.*, 19 (3) , pp. 1071-1077. (erişim tarihi: 01.01.2012)
- Afoakwa, E. O. (2010) *Chocolate Science and Technology*, Wiley-Blackwell, Oxford. (Erişim Tarihi: 07.02.2010).
- Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa production and processing technology*. CRC Press. (erişim tarihi: 01.08.2014)
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), 290–298. (erişim tarihi: 01.06. 2007).
- Afoakwa, E.O., (2011). *Chocolate Science and Technology* (Google eBook). Wiley Blackwell. (erişim tarihi: 08.04.2011).
- Agostoni C ., Decsi T., Fewtrell M., Goulet O., Kolacek S., Koletzko B., Michaelsen K.F., Moreno L., Puntis J., Rigo J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., van Goudoever J.,(2008), Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 46 , pp. 99-110. (erişim tarihi: 18.04.2008).
- Ahring, K.; Bélanger-Quintana, A.; Dokoupil, K.; Ozel, H.G.; Lammardo, A.M.; MacDonald, A.; Motzfeldt, K.; Nowacka, M.; Robert, M.; van Rijn, M., (2009). Dietary management practices in phenylketonuria across , European centres. *Clin. Nutr.*, 28, 231–236. (erişim tarihi: 15.05.2009).

- Aikpokpodion P.O., (2007). Genetic diversity in Nigerian cacao, *Theobroma cacao* L. collections as revealed by phenotypic and simple sequence repeats marker. Ph.D. Thesis submitted to the University of Ibadan Nigeria, 147 pp. (erişim tarihi: 02.11.2008).
- Akin D. E., Condon B., Sohn M., Foulk J. A., Dodd R. B., Rigsby L., (2007). Optimization for Enzyme- Retting of Flax with Pectate Lyase, *Industrial Crops and Products*, 25: 136-146. (erişim tarihi: 24.05.2007).
- Aktar, T., (2017). Oral Journey of Chocolate; From the First Bite to Swallowing. In H.Arapgirlioglu., A. Atik, R. L. Elliott, & E. Turgeon (Eds.), *Researches on Science and Art: Ist edn. Gece Kitaplığı*, (pp. 1087–1092). (erişim tarihi, 01.07.2017).
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., & Kelimeler, A. (2010). Bitkisel ürünlerin vegidaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler The assays used for assessing antioxidant capacities of herbal products and foods. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401–409. (erişim tarihi: 01.08.2010).
- Alexander R. and Maltodextrins R.(1992). Production, properties and applications. In: Schenk F, Hebda R (ed.) *Starch hydrolysis products; worldwide technology: production and applications*, New York, p. 62-122. (erişim tarihi: 06.02.19).
- Altimiras P., Pyle L., Bouchon P., (2007). Structure–fat migration relationships during storage of cocoa butter model bars: bloom development and possible mechanisms *J. Food Eng.*, 80, pp. 600-610. (erişim tarihi, 22.08.2006).
- Amdrup, E., and Jorgensen, J. B. (1957), Further investigations on the pathogenesis of the dumping syndrome with special reference to the role of distension of efferent loop. *Acta chirurg. Scand.* 113, 22. (erişim tarihi, 20.02.1957).
- Anese, M., Bortolomeazzi, R., Manzocco, L., Manzano, M., Giusto, C., & Nicoli, M.C. (2009). Effect of chemical and biological dipping on acrylamide formation and sensory properties in deep-fried potatoes. *Food Research International*, 42 (1), 142-147. (erişim tarihi 04.06.2008).
- Anon (1991). *Product sheet of Viscozyme L*. Novo Nordisk A/S, Enzymes process division, Bagsvaerd, Denmark.
- Anonim (2017a). <http://www.pkuaile.com> . (erişim tarihi, 14.07.2017).
- Anonim (2018). Proteinler, [Http://Www.Swisspku.Ch/](http://Www.Swisspku.Ch/) (erişim tarihi, 12.01.2018).
- AOAC. (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington. (erişim tarihi, 09.12.2016).
- Aprotosoiaie A.C., Luca S.V., Miron A., (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-An overview, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (1), pp. 73-91. (erişim tarihi, 18.11.2015).
- Arana-Peña S., Carballares D., Berenguer-Murcia Á., Alcántara A.R. , Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., (2020). One pot use of combilipases for full modification of oils and fats: multifunctional and heterogeneous substrates. *Catalysts*, 10, p. 605.

- Araujo R., Fernandes C., Ribeiro D., Efraim P., Steinmacher D., Lieberei R., Bastide P., Araujo T.G., (2014). Cocoa Quality Index - A proposal, Food Control Volume 46, Pages 49-54. (erişim tarihi, 05.03.2014).
- Argent A.C., Balachandran R., Vaidyanathan B., Khan A., Kumar R.K., (2017). Management of undernutrition and failure to thrive in children with congenital heart disease in low- and middle-income countries. *Cardiol Young*, 27, pp. S22-S30. (erişim tarihi, 05.02.2017).
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Grosso, E. Del, Minassi, A., et al. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106(3), 967–975.
- Armstrong MD, Tyler FH. 1955. Studies on phenylketonuria. I. Restricted phenylalanine intake in phenylketonuria. *J Clin Invest* 34(4):565–80. (erişim tarihi, 30.04.1995).
- Arslan, K. (2010). Batı Karadeniz Bölgesindeki Akraba Evliliklerinde Kronik Ve Genetik Hastalıklar Sıklığının Araştırılması. DÜZCE ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. (erişim tarihi, 01.07.2010).
- Awad T.S., Marangoni A., (2006). Ingredient interactions affecting texture and microstructure of confectionery chocolate. A. McPherson, A.G. Gaonkar (Eds.), *Ingredient Interactions 2*, CRC Press, Boca Raton , p. 423. (erişim tarihi, 20.12.2005).
- Awua, P. K. (2002) *Cocoa Processing and Chocolate Manufacture in Ghana*, David Jamieson and Associates Press, Saffron Walden, Essex. (erişim tarihi, 20.11.2020).
- Azam S., Hadi N., Khan U. N., et al. (2003) Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 9, 325–330. (erişim tarihi, 09.02.2018).
- b. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL., (2010). Phenylketonuria *The Lancet*. ;376(9750):1417–1427.
- Baba S., Osakabe N., Kato Y., et al., (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 85, pp. 709-717. (erişim tarihi, 03.03.2007).
- Balzer J., Rassaf J., Heiss C., et al. (2008), Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 51, pp. 2141-2149. (erişim tarihi, 03.06.2008).
- Başaran N, Cenani A, Şaylı BS, Özkinay Ö, Artan S, Seven H, Başaran A, Dinçer S (1992). Consanguineous Marriages Among Parents of Down Patient. *Clinical Genetics*, 42: 13-15. (erişim tarihi, 09.07.1992).
- Başoğlu F., Uylaşer V., (2011). *Temel Gıda Analizleri kitabı*, sf.73-75. (erişim tarihi, 01.04.2011).

- Batista N.N., de Andrade D.P., Ramos C.L., Dias D.R., Schwana R.F., (2016). Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*, 90 , pp. 313-319. (erişim tarihi, 01.12.2016).
- Battelino T., Krzysnik C., Pavlin K., (1994). Early detection and follow up of children with phenylketonuria in Slovenia, *Zdrav. Vestn.* 63 , 25–28.
- Beckett S.T., (2008). *The Science of Chocolate*, 2nd ed., The Royal Society of Chemistry, RSC publishing, Cambridge
- Beckett S.T., (2010). Controlling the flow properties of liquid chocolate
- Beckett S.T., (2017). Fowler M.S., Ziegler G.R., Beckett's: Industrial chocolate manufacture and use, Formerly of Nestle UK
- Beckett, S. T. (2000) *The Science of Chocolate*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. (erişim tarihi, 01.02.2002).
- Beckett, S. T., (2009). *Industrial Chocolate Manufacture and Use* (4th ed). Oxford: Blackwell Publishers Inc.
- Becraft P. ve Yi G. (2011). Tahıl tanelerinde aleurone gelişiminin düzenlenmesi. *Deneyisel Botanik Dergisi*, 62 (5), 1669-1675.
- Beg M.S., Ahmad S., Jan K., Bashir K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa-A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 66, pp. 108-116. (erişim tarihi, 10.06.2017).
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292> (erişim tarihi, 15.07.1996)
- Berbert, P. R. F. (1976) Influência das condições climáticas na composição química e características físicas da manteiga de cacau. *Revista Theobroma (Brasil)*, 6, 67–76.
- Bertazzo A., Comai S., Mangiarini F., and Chen S., (2012). Composition of Cacao Beans. *Chocolate in Health and Nutrition*. pp 105–11.
- Bhaskar B., Ananthanarayan L., Jamdar S., (2019). Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. *LWT- Food Science and Technology*, 103, pp. 155-161.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265(6790):812–3.
- Bilgin Ö., Çarlı U., Erdoğan S., Maviş M.E., GoksuGursu G., Yılmaz M., (2018). Karadeniz’de avlanan hamsi balığı, *Engraulis encrasicolus*, etinin amino asit içeriğinin LCMS/MS kullanılarak tespiti. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(4): 465-470.
- Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U., (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab*;104(Suppl):S2–S9.

- Blau N., SHEN N. and CARDUCCI C.,(2014). Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 14: 655–671.
- Bonner, P. L. R. (2007). *Protein Purification*. Taylor and Francis Group, Milton Park Abingdon, UK.
- Bowersox J.,(2000). National Institutes of Health Consensus Development Panel, National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Phenylketonuria (PKU): Screening and Management, October 16–18, Pediatrics (2001)108 , 972–982.
- Boye J., Zare F., & Pletch A., (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res Int*, 43(2), 414– 431.
- Braga S. C. G. N., Oliveira, L. F., Hashimoto, J. C., Gama, M. R., Efraim, P., Joppi, R. J., Augusto, F. (2018). Study of volatile profile in cocoa nibs, cocoa liquor and chocolate on production process using GC X GX-QMS. *Microchemical Journal*, 141, 353–361.
- Branch A., Byrne P., Costa A., Entzminger C., Fredericq A., Gilmour M., Laird G., Matissek R., Quintana S., Ruiz S., and Sigley P., (2016). Cocoa Beans Industry Quality Requirements. April 104; 11-12.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brosco J.P. , Paul D.B., (2013). The political history of PKU: reflections on 50 years of newborn screening, *Pediatrics* 132, 987–989.
- Bucheli P. , Rousseau G. , Alvarez M. , Laloi M. , and McCarthy J., (2001). Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds . *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 49 : 5046 – 5051.
- Burgard P., (2000). Development of intelligence in early treated phenylketonuria *European Journal of Pediatrics*, 159 (Suppl. 2), pp. S74-S79.
- Büyükkurt K. Ö., Erbaş M., İnan M., Anıl M., (2018). FENİLKETONÜRİ HASTALARINA YÖNELİK FENİLALANİN İÇERİĞİ AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ. *Gıda the Journal of food*, 43 (5): 812- 825.
- Büyüklimanlı A. ve Atıcı O., (2015). Sonbahar atığı yapraktan poliüretan üretimi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalı, Yüksek lisans tezi, 23, pp 1-73.
- Büyüktuncel E., (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 17:93-103.

- Cádiz-Gurrea M.L., Fernández-Ochoa A., Leyva-Jiménez A., Guerrero-Muñoz N., Villegas-Aguilar M.C, Pimentel-Moral S., Segura-Carretero A., (2020). LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru cocoa by-products for commercial applications..Molecules, 25 , p. 3177
- Callebaut, B. (2017). Ever thought about where your chocolate comes from? 5pp. <https://www.barrycallebaut.com/sites/default/files/2019-01/barry-callebaut-forever-chocolate-progress-report-2016-17.pdf>.
- Calligaris S., Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C., (2004). Effect of heattreatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk International Dairy Journal, 14: 421-427.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., & de Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(3), 964–973.
- Cemeroğlu B, (2010). Gıda Analizleri kitabı, Gıda Teknolojisi Yayınları, Ankara, sf. 70-80.
- Cerit İ., Şenkaya S., Tulukoğlu B., Kurtuluş M., Seçilmişoğlu Ü.R., Demirkol O., (2016). ENRICHMENT OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF WHITE CHOCOLATES WITH CORNELIAN CHERRY, SPINACH AND POLLEN POWDERS. Gıda, 41 (5): 311-316.
- Chaiser, S. and Dimick, P. (1987) Cocoa butter – Its composition and properties. Manufacturing Confectioner, 67, 115–122.
- Channon S, Goodman G, Zlotowitz S, Mockler C, Lee PJ., (2007). Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome. Arch Diseases Child ;92:213-8.
- Chen F., Zhang Q., Gu H., Yang L., (2016). An approach for extraction of kernel oil from Pinus pumila using homogenate-circulating ultrasound in combination with an aqueous enzymatic process and evaluation of its antioxidant activity J. Chromatogr. A, 1471 , pp. 68-79
- Choi Y., Lee S.M., Chun J., Lee H.B., Lee J., (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic 64 Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences Meral compounds of Shiitake (Lentinus edodes) mushroom. Food Chemistry, 99: 381-387.
- Christ S.E., (2003). Asbjorn folling and the discovery of phenylketonuria J. Hist. Neurosci., 12 (1), pp. 44-54.
- Clarke T. R. J. (2000). Hyperphenylalaninaemias. ‘Inborn Metabolic Diseases’ (Ed. J.Fernandes, J.M. Saudubray, G. Va den Berghe, 3rd edition), Verlag Berlin Heidekberg, Germany, 169-184,
- Cleary M.A., (2014). Phenylketonuria. Symposium: Inborn Errors of Metabolism. Paediatrics and Child Health, 25: 3

- Cliff M.A., Law J.R., Lucker J., Scaman C.H. and Kermode A.R., (2016). Descriptive and hedonic analyses of low-Phe food formulations containing corn (*Zea mays*) seedling roots: toward development of a dietary supplement for individuals with phenylketonuria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 140–149.
- Codex Alimentarius. Codex standard for cocoa (cacao) mass (cocoa/chocolate liquor) and cocoa cake. Codex Stan 141-1983, Rev. 1-2003, 2003.
- Coe, S. D., & Coe, M. D. (2013). *True History of Chocolate 3e*. UK: Thames and Hudson, London, Google Scholar
- Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A., & Delvaux, F. R. (2006). Development of maillard reaction related characteristics during malt roasting. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 148–156.
- Comert K.T., Merdol K.T., (2018). Çikolata ve Sağlık Beyanları. *Journal of Nutrition and Dietetics* 46(1):56-65
- Cooper K.A., Donovan J.L., Waterhouse A.L., Williamson G., (2007). Cocoa and health: A decade of research *British Journal of Nutrition*, 99 (1) , pp. 1-11
- Cope F.W. (1984).Cacao *Theobroma cacao* (sterculiaceae), N.W. Simmonds (Ed.), *Evolution of crops plants*, Longman, London UK , pp. 285-289
- Corti R., Flammer A. J., Hollenberg N. K., & Luscher T. F., (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119, 1433e1441.
- Cotelle, N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1, 569–590.CrossRefGoogle ScholarPubMed
- D’Souza R.N., Grimbs S., Behrends B., Bernaert H., Ullrich M.S., Kuhnert N. (2017), Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. *Food Research International*, 99 ,pp. 550-559
- Dand R.(2010). *The International Cocoa Trade* (3rd Ed.). UK: Elsevier Science
- Debaste F., Kegelaers Y., Liégeois S., Ben Amor H., Halluin V., (2008). Contribution to the modelling of chocolate tempering process. *J. Food Eng.*, 88, pp. 568-575.
- Delgado P. A., Vignoli J. A., Siika-Aho M., Franco T. T., (2008). Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis.*Food Chemistry*. Jan 31. 168–176.
- Delgado-Ospina J., Mattia C.D., Paparella A., Mastrocola D., Martuscella M., Chaves-Lopez C., (2020). Effect of fermentation, drying and roasting on biogenic amines and other biocompounds in Colombian criollo cocoa beans and shells *Foods*, 9 (4) , p. 520
- Demirkol M. (2002) *Metabolizma Hastalıkları*. In: Neyzi O., Ertuğrul T. (eds) *Pediatric 1*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- DeZaan Cocoa Manual (2009) *De Zaan Cocoa and Chocolate Manual*. ADM Cocoa International, Rolle
- Dina S.F., Napitupulu F.H., Ambarita H., (2013). Study on varies drying methods of cocoa beans in Indonesia (in Bahasa),*J. Ris. Ind.*, 7 (1), pp. 35-52

- Djikeng F.T., Teyomonou W.T., Tenyang N., Tiencheu B., Morfor A.M., Touko B.A.H., (2018). Effect of traditional and oven roasting on the physicochemical properties of fermented cocoa beans, *Heliyon*, volume 4, issue 2.
- Dugo L., Tripodo G., Santi L., Fanali C., (2018). Cocoa polyphenols: Chemistry, bioavailability and effects on cardiovascular performance. *Current Medicinal Chemistry*, 25, pp. 4903-4917
- Dzahini-Obaitey, H., Domfah, O. and Amoah, M.F. (2010) Over seventy years of viral disease of cocoa in Ghana: from researchers' perspective. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (7), 476–479.
- Efraim P., Pezoa-García N.H., Jardim D.C.P., Nishikawa A., Haddad R., Eberlin M.N., (2010). Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance *Food Sci. Technol.*, 30 , pp. 142-150
- El Gharras H., (2009), Polyphenols: food sources, properties and applications - a review., *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2512–2518.
- Environmental performance of cocoa production from monoculture and agroforestry systems in Indonesia. *J. Clean. Prod.*, 134 , pp. 583-591 van Calcar SC, Ney DM., (2012). Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *J Acad Nutr Diet* 112(8):1201–10.
- Etaware P.M., (2021). The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate(s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, volume 3, 30 December, 1-10.
- Etzel MR., (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr* 134(4):996S-1002S
- European Union. Directive, (2000), 2000/36/EC of the European Parliament and of the Council of 23 June 2000 relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption.
- Ezgu F., (2017). Inborn Errors of Metabolism. In: Makowski GS (eds.). *Advances in Clinical Chemistry*, 1 st ed. USA, Academic Press : 196-251.
- Fadimu G.J., Gill H., Farahnaky A., Truong T., (2022). *Food Chem.* 383, 132457.
- Fang B, Eisensmith RC, Li XH, Finegold MJ, Shedlovsky A, Dove W, Woo SL., (1994). Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Gene Therapy* 1(4):247–54
- FAO, Chocolate: facts and figures - world cocoa production and chocolate products exports and imports ,<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/277756/>, (2015).
- FAOSTAT, Database Collections, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2016) <http://faostat.fao.org>. (Accessed 7).

- Fayeulle N., Meudec E., Boulet J.C., Vallverdu-Queralt A., Hue C., Boulanger R., ..., Sommerer N., (2019). Fast discrimination of chocolate quality based on average-mass-spectra fingerprints of cocoa polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (9) , pp. 2723-2731.
- Ferreira, C. R., and van Karnebeek, C. D. M. (2019). Inborn Errors of Metabolism. *Handb. Clin. Neurol.* 162, 449–48
- Figueroa-Hernández C., Mota-Gutierrez J., Ferrocino I., Hernández-Estrada Z.J., González-Ríos O., Cocolin L., Suárez-Quiroz M.L., (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.*, 301, pp. 41-50
- Filkova, I., Huang, L. X., Mujumdar, A. S. (2006). Industrial Spray Drying Systems. A. S. Mujumdar (Ed.). *Handbook of Industrial Drying*. (pp. 215-256). Boca Raton.
- Fowler M.S., (2008). *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK , pp. 10-47.
- Fowler, M. S., (1999). Cocoa beans: from tree to factory, in *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 3rd edn (ed. S. T. Beckett), Blackwell Science, Oxford, pp. 8–35.
- Fowler, M.S., (2009). Cocoa beans: from tree to factory. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 4th Edition; Beckett, S.T., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford; p. 20.
- Fraudendorfer F., Schieberle P., (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (21), pp. 10244-10251.
- Gai Q.Y., Jiao J., Mu P.S., Wang W., Luo M., Li C.Y., Zu Y.G., Wei F.Y., Fu Y.J., (2013). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.*, 45 , pp. 303-311.
- Gamli Ö.F., (2015). *Laboratuvar Teknikleri ve Temel Gıda Analizleri kitabı*, 232, 185-186.
- Ghelich S., Ariaii P., Ahmadi M., (2022). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 28, 1.
- GILBERT-BARNES, E. and FARRELL, P.M. 2016. Approach to diagnosis of metabolic diseases. *Translational Science of Rare Diseases*, 1: 3–22
- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. (2007) Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *Journal of Inheret Metabolic Disease*;30:145-52
- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E., (2012). Phenylketonuria:nutritional advances and challenges. *Nutr Metab* 9(1):1–7.
- Goldson A., Lam M., Scaman C.H., Clemes S. and Kermode A., (2008). Screening of phenylalanine ammonia lyase in plant tissues and retention of activity during dehydration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 619-625.
- Gong X., Hui X., Wu G., Morton J.D., Brennan M.A., Brennan C.S., (2022). *Food Res. Int.* 152, 110715.

- Grassi D., Desideri G., Necozone S., *et al.* (2008). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr.*, 138, pp. 1671-1676
- Grassi D., Lippi C., Necozone S., Desideri G., Ferri C., (2005)., Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons, *Am J Clin Nutr*, 81 , pp. 611-614
- Groselja, U., Tanseka, M., & Battelin, T. (2014). Fifty years of phenylketonuria newborn screening — A great success for many, but what about the rest? *Molecular Genetics and Metabolism*, 113-1/2
- Gu L, House, SE, Wu, X, et al. (2006) Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agric Food Chem* 54, 4057–4061.
- Guehi S.T., Dabonne S., Ban-Koffi L., Kedjebo D.K., Zahouli G.I.B., (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans, *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2 (3), pp. 163-171.
- Gültekin-Özgüven, M., Berktaş, I., & Özçelik, B. (2016). Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 252–259.
- Güney M., (2019). *Pediatric Metabolism Diseases in Nutrition Conference Booklet*, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Kuşagımızda Beslenme Kulübü, 23:1-64.
- Haque, M. A., Timilsena, Y. P., Adhikari, B. (2015). *Spray drying. Drying Technologies for Foods: Fundamentals ve Applications*. Nema, P. K. Kaur, B. P. Mujumdar, A. S. (Eds.). (pp.79-106). New India Publishing Agency, India.
- Hampe MH, Panaskar SN, Yadav AA, Ingale PW. Gas chromatography/mass spectrometry-based urine metabolome study in children for inborn errors of metabolism: An Indian experience. *Clin Biochem*. 2017;50(3):121-126.
- Handoom B., Megdad E., Al-Qasabi D., vd. (2018). The effects of low protein products availability on growth parameters and metabolic control in selected amino acid metabolism disorders patients. *Int J Pediatr Adolesc Med*.5(2):60–68.
- Hansen C.E., Olmo M., Burri C., (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 77 , pp. 273-281.
- Hartel R. W., (2001). *Crystallization in Food*, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Health K. W., (2020). Cocoa uses, benefits and dosage. <https://www.drugs.com>. Last updated on Jan 6, 14pg.
- Hebbbar, P., Bittenbender, H. C. and O'Doherty, D. (2011) Farm and forestry production and marketing profile for cacao (*Theobroma cacao*). Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry, [http:// agroforestry.net/scps](http://agroforestry.net/scps) (accessed 10 August, 2011).

- Herrera M.L., Hartel R.W., (2000). Effect of processing conditions on the crystallization kinetics of milk fat model systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, pp. 1177-1187
- Hii C.L., Law C.L., Cloke M., Suzannah M., (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality, *J. Bio-sys. Eng.* (102), pp. 153-161
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M., (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(4), 702–722
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87
- Hu B., Wang H., He L., Li Y., Li C., Zhang Z., Liu Y., Zhou K., Zhang Q., Liu A., (2019). A method for extracting oil from cherry seed by ultrasonic-microwave assisted aqueous enzymatic process and evaluation of its quality *J. Chromatogr. A*, 1587, pp. 50-60
- ICCO (2012) *The World Cocoa Economy: Past and Present*. Report presented to the Executive Committee at the 146th Meeting, International Cocoa Organization, London
- ICCO, (2017) . *Quarterly Bulletin of Statistics* , The International Cocoa Organization, London
- ICCO, (2019). *Production of cocoa beans Quarterly bulletin of cocoa statistics. Cocoa year 2018/19, XLV, Vol. 3 (2019) Published*
- Ioannone, F., Di Mattia, C. D., De Gregorio, M., Sergi, M., Serafini, M., & Sacchetti, G. (2015). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing, *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.09>
- Ishaq S., Jafri L., (2017). Biomedical Importance of Cocoa (*Theobroma cacao*): Significance and Potential for the Maintenance of Human Health. *Journal of Matrix Science Pharma*, 1(1), 01-05
- Jahja R., Huijbregts S.C., de Sonnevile L.M., van der Meere J.J., van Spronsen F.J., (2014). Neurocognitive evidence for revision of treatment targets and guidelines for phenylketonuria. *J. Pediatr.*, 164 , pp. 895-899
- Jalil .A.M., Amin İ., (2008). Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health., *Molecules*, 13, 2190- 2219.
- Janek K., Niewianda A., Wöstemeyer J., Voigt J., (2016). The cleavage specificity of the aspartic protease of cocoa beans involved in the generation of the cocoa-specific aroma precursors, *Food Chemistry*, 211, pp. 320-328
- Jiang L., Hua D., Wang Z., Xu S., (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food Bioprod. Process.*, 88, pp. 233-238.
- Jiao J., Li Z.G., Gai Q.Y., Li X.J., Wei F.Y., Fu Y.J., Ma W., (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chem.*, 147, pp. 17-24.

- John W.A., Kumari N., Böttcher N.L., Koffi K.J., Grimbs S., Vrancken G., ..., Ullrich M.S., (2016). Aseptic artificial fermentation of cocoa beans can be fashioned to replicate the peptide profile of commercial cocoa bean fermentations Food Research International, 89 , pp. 764-772
- Jovanovic, O., Karlovic, D.J., Jakovljevic, J., (1995). Chocolate pre-crystallization: a review. Acta Alimentaria 24, 225–239.
- Kara A. 2012. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Metabolizma Hastalıkları ve Beslenme Polikliniğinde Tanı Alan veya Takibe Giren Kalıtsal Metabolik Hastalığı Olan Hastaların Tanılarının, Klinik ve Laboratuvar Bulgularının Analizi İle Takip Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 164 s
- Kaufman S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. J Pediatr 1989;895-900.
- Kedare S.B., Singh R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology, 48 (4): 412-422
- Khanji, A.N., Michaux, F., Petit, J., Salameh, D., Rizk, T., Jasniewski, J., Banon, S. (2018). Structure, gelation, and antioxidant properties of curcumin-doped casein micelle powder produced by spray-drying. Food and Function, 9, 971-981.
- Kim J., Lee W. K., Lee J. H., (2011). Chapter 42 - Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health., Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, pp 351-360.
- Kim S.Y., Jeong S.M., Park W.P., Nam K.C., Ahna D.U., Lee S.C., (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extract. Food Chemistry, 97: 472-479.
- Kim W., ERLANDSEN, H., SURENDRAN, S., STEVENS, R.C., GAMEZ, A., MICHOLS-MATALON, K., TYRING, S.K. and MATALON, R., (2004). Trends in Enzyme Therapy for Phenylketonuria. Molecular Therapy, 10 (2): 220-224
- Koch R, Moseley KD, Yano S, Nelson M, Moats RA., (2003). Large neutralamino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach totreatment. Mol Genet Metabol 79(2):110–3.
- Kongor J.E., Hinneh M., de Walle D.V. , Afoakwa E.O., Boeckx P., Dewettinck K., (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — a review. Food Res. Int., 82 ,pp. 44-52
- Köksal, G., Gökmen, H. (2008). Metabolik Hastalıklarda Beslenme , Ankara: Hatiboğlu Yayınları. Retrieved Ekim Cuma.
- Köksal, G., Gökmen, H. (2015). Çocuk Hastalıklarında Beslenme Tedavisi, Fenilketonüri. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayın No: 728; 7,1-40
- Kruszewski B., Obiedziński M.W., (2018). Multivariate analysis of essential elements in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 98, pp. 113-123

- Kumar, A., & Duhan, J. S. (2011). Production and Characterization of Amylase Enzyme Isolated From *Aspergillus Niger* Mtcc-104 Employing Solid State Fermentation, 250–258.
- Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: A novel clinical entity. *J Pediatr* 1999;135:375–378.
- Qin X.W., Lai J.X., Tan L.H., Hao C.Y., Li F.P., He S.Z., Song Y.H., Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China, *Int. J. Food Prop.*, 20 (10) (2017), pp. 2261–2275
- Lam, M., Scaman, C.H., Clemens, S. and Kermode, A., (2008). Retention of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Wheat Seedlings during Storage and in Vitro Digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 11407–11412.
- Lara MG, Izumi C, Greene LJ, Vilela L, Freitas O., (2005). Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey proteins. *Brazilian J Pharm Sci* 41(4):459–66.
- Latif S., Anwar F., (2011). Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food Chem.*, 125, pp. 679–684.
- Lecumberri E., Goya L., Mateos R., Alía M., Ramos S., Izquierdo-Pulido M., (2007). A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats, *Nutrition*, 23 (4), pp. 332–341
- Lefebvre T., Janssens M., Camu N., Vuyst L. De., (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation, *Applied and Environment Microbiology*, 76 (23), pp. 7708–7716
- Lefebvre T., Papalexandratou Z., Gobert W., Camu N., De Vuyst L., (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30 (2), pp. 379–392
- Lenfant F., Hartmann C., Watzke B., Breton O., Loret C., Martin N., (2013). Impact of the shape on sensory properties of individual dark chocolate pieces, *LWT-Food Sci. Technol.* 51, 545–552
- Leon K., Mery D., Pedreschi F., Leon J., (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food Res. Int.*, 39 (10), pp. 1084–1091
- Li X.J., Li Z.G., Wang X., Han J.Y., Zhang B., Fu Y.J., Zhao C.J., (2016). Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from *Cucurbita pepo* L. And evaluation of hypoglycemic effect. *Food Chem.*, 212, pp. 403–410.
- Li Y., Yu J., Goktepe I., Ahmedna M., (2016 a). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*, 196, pp. 1338–1345.

- Liemburg, G.B. et al. 2015. Is BRIEF a useful instrument in day to day care of patients with phenylketonuria?. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114: 425-430.
- Lim K, van Calcar SC, Nelson KL, Gleason ST, Ney DM., (2007). Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Mol Genet Metabol* 92(1):176–8.
- Liu J., Liu M., He C., Song H., Guo J., Wang Y., *et al.* (2015). A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: Relationship to sensory perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (6) , pp.
- Liu L., Chen J., Li X., (2021). *Process Biochem.* 111, 200.
- Liu Z., Gui M., Xu T., Zhang L., Kong L., Qin L., Zou Z., (2019). Efficient aqueous enzymatic-ultrasonication extraction of oil from *Sapindus mukorossi* seed kernels. *Ind. Crops Prod.*, 134, pp. 124-133.
- Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC., (2006). Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr Food Sci* 36(2):96–104
- Ludovici V., Barthelmes J., Nägele M.P., Enseleit F., Ferri C., Flammer A.J., ..., Sudano A.J., (2017). Cocoa, blood pressure, and vascular function. *Frontiers in Nutrition*, 4, p. 36.
- Maarel, M.J.E.C., Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94:137–155.
- MacCready RA. 1974. Admissions of phenylketonuric patients to residential institutions before and after screening programs of the newborn infant. *JPediatric* 85(3):383–5
- MacDonald A, Cochrane B, Wopereis H, Loveridge N., (2011). Specific prebiotics in a formula for infants with Phenylketonuria. *Mol Genet Metabol* 104:S55–9.
- MacDonald A, Dixon M, White F., (2007). Disorders of amino acid metabolism, organic acidaemias and urea cycle defects. Shaw V, Lawson M (eds). *Clinical Paediatric Dietetics* 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 309-80
- MacDonald A., Evans S., Cochrane B., Wildgoose J., (2012). Weaning infants with phenylketonuria: a review *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the Br. Dietetic Assoc.*, 25 , pp. 103-110
- MacLeod EL, Ney DM. 2010a. Nutritional management of phenylketonuria. *Ann Nestle (English ed.)* 68(2):58–69.
- Madhok A.B., Ojamaa K., Haridas V., Parnell V.A., Pahwa S., Chowdhury D., (2006). Cytokine response in children undergoing surgery for congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*, 27, pp. 408-413
- Mak, C. M., Lee, H.-C. H., Chan, A. Y.-W., and Lam, C.-W. (2013). Inborn Errors of Metabolism and Expanded Newborn Screening: Review and Update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50, 142–162. doi:10.3109/10408363.2013.847896
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Singhal, R. S. (2017). Enzyme-assisted extraction of bioactives. *Food Bioactives*, 171–201.

- Marseglia A., Dellafiora L., Prandi B., Lolli V., S. Sforza, Cozzini P., Caligiani A., Simulated gastrointestinal digestion of cocoa: Detection of resistant peptides and In silico/In vitro prediction of their ACE inhibitory activity, *Nutrients*, 11 (2019), p. 985.
- Marseglia A., Musci M., Rinaldi M, Palla G., Caligiani A., Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins, *Food Res. Int.*, 132 (October 2019) (2020), p. 109101
- Marseglia A., Palla G., Caligiani A., (2014). Presence and variation of γ -aminobutyric acid and other free amino acids in cocoa beans from different geographical origins *Food Res. Int.*, 63 , pp. 360-366
- Meinlschmidt P., Sussmann D., Schweiggert-Weisz U., Eisner P., (2016). Enzymatic treatment of soy protein isolates: Effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Sci. Nutr.* 4, 11–23.
- Mellor D. D., Sathyapalan T., Kilpatrick E. S., Beckett S., & Atkin S. L., (2010). High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabetic Medicine*, 27(11), 1318-1321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03108.x>.
- Meng S., Tan Y., Chang S., Li J., Maleki S., Puppala N., (2020). *Food Chem.* 302, 125186.
- Meral R., (2011). Fonksiyonel Öneme Sahip Doğal Bileşenlerin Hamur ve Ekmek Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. (doktora tezi, yayınlanmamış). YYÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Van
- Misnawi S. J., Nazamid S., Jamilah B., (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chem.*, 78, pp. 407-417
- Moreira I.M. da V., Vilela L. de F., Santos C., Lima N., Schwan R.F., (2018). Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil, *Food Res. Int.*
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladisch M., (2005). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technology*, 96: 673-686.
- Mossu, J. (1992) *Cocoa*, Macmillan Press, London.
- Mota-Gutierrez J., Barbosa-Pereira L., Ferrocino I., Cocolin L. (2019) Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits, *Nutrients*, 11 (4).
- Nadar, S. S., Rao, P., Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330.
- Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M et al. (2011) Crosssectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening. *J Bone Miner Metab* 29(6):737-43.

- Naik M., Natarajan V., Rawson A., Rangarajan J., Manickam L., (2021). Extraction kinetics and quality evaluation of oil extracted from bitter gourd (*Momardica charantia* L.) seeds using emergent technologies. *LWT.*, 140 , Article 110714.
- Najafi M.F., Deobagkar D., Deobagkar D., (2005). Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, *Protein Expression and Purification*, 41, 349-354.
- Ney D.M. , Gleason S.T. , vanCalcar S.C., MacLeod E.L., Nelson K.L., Etzel M.R., Rice G.M., Wolff , J.A., (2009). Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 32 (1), pp. 32-39.
- Nolasco-Arroyo B.Y., Ovando-Chacón S.L., Tacias-Pascacio V.G., Ovando-Chacón G.E., Ventura-Canseco C., Meza-Gordillo R., Rosales-Quintero A., (2019). Aqueous enzymatic extraction of oil from microwave-pretreated Jicaro seeds. *Curr. Biochem. Eng.*, 5 , pp. 42-49.
- Novak P., & Havli V. (2016). 4-Protein Extraction and Precipitation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, 51-62.
- Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S. O., Chuck-Hernández, C. (2017). Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 543–555.
- Oliviero T., Capuano E., Cammerer B., Fogliano V., (2009). Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 147-152
- Omobuwajo T. O., Busari O. T., Osemwegie A. A., (2000). Thermal agglomeration of chocolate drink powder. *Journal of Food Engineering*, 46(2): 73-81.
- Oracz J., Nebesny E., (2016). Antioxidant properties of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of cultivar and roasting conditions. *International Journal of Food Properties*, 19, pp. 1242-1258.
- Özalp I., Coşkun T., Tokatli A., Kalkanoğlu H.S., (2001). Newborn PKU screening in Turkey: At present and organization for future., *The Turkish journal of pediatrics*, (43)2:97-101
- Özyiğit Y., (2002). The Effect of different cutting time on the yield quality and agricultural characteristics of some forage plants used as bee plant.
- Parlak Ö., Dündar A.N., (2021). Production of low protein and gluten-free cookies for phenylketonuria (PKU) and/or celiac patients. *Czech Journal of Food Sciences*, 39, (1): 29–34.
- Passos C.P., Yilmaz S., Silva C.M., Coimbra M.A., (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chem.*, 115, pp. 48-53.
- Payne M.J. , Hurst W.J., Miller K.B., Rank C. , Stuart D.A., (2010). Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (19) , pp. 10518-10527

- Peláez P.P, Bardón I., Camasca P., (2016). Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. *Scientia Agropecuaria*, 7, pp. 355-365.
- Pérez J., Munoz-Dorado J., De la Rubia T., Martinez J., (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview *International Microbiology*, 5 (2), pp. 53-63
- Pimentel, F., ALVES, R.C., COSTA, A.S.G., TORRES, D., ALMEIDA, M.F., BEATRIZ, M. and OLIVEIRA, P.P., (2014). Phenylketonuria: Protein content and amino acids profile of dishes for phenylketonuric patients. The relevance of phenylalanine. *Food Chemistry*, 149: 144–150.
- Prabakaran, P., Ravindran, A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53(2), 150-154.
- Prasad C, Dalton L, CDE R, Levy H. (1998),. Role of diet therapy in management of hereditary metabolic diseases. *Nutr Research* 18 (2):391-402.
- Prior R.L., Wu X., Scaich K., (2005). Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8): 4290-4302.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Ramiro-Puig E, and Castell M. (2009),. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr* 101: 931–40
- Ramos S., Martín M.A., Goya L., (2017).Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus *Antioxidants*, 6 , p. 84
- Raters M., Schnapka J., Heeger R., Matissek R., (2014). Fine Flavour or bulk cocoa? A Classification on the basis of the T/C Ratio. LCI, Food Chemistry Institute of the Association of the German Confectionery Industry (BDSI), Adamsstraße 52-54, 51063 Cologne, www.lci-koeln.de
- Rawel H.M., Huschek G., Sagu S.T., Homann T., (2019). Cocoa bean proteins-characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing, *Nutrients*, 11 (2), p. 428.
- Redgwell R.J., Trovato V., Curti D., (2003a). Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food Chem.* 80:511–6.
- Redgwell RJ, Trovato V, Merinat S, Curti D, Hediger S, Manez A.,(2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chem.* 81:103–12.
- Rhim, J., Wu, Y., Weller, C., & Schnepf, M. (1999). Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. *Journal of Food Science*, 64(1), 149–152
- Ribeiro, L.C., da Costa, J.M.C. & Afonso, M.R.A., (2020). Flow behavior of cocoa pulp powder containing maltodextrin. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23(Ci), pp.1–8.

- Rimbach G., Egert S., de Pascual-Teresa S. (2011), Chocolate: (un)healthy source of polyphenols, *Genes & Nutrition*, 6 (1), pp. 1-3
- Rocha J.C., MacDonald A. (2016), Dietary intervention in the management of phenylketonuria: current perspectives. *Pediatric Health Med. Therap.*, 7, pp. 155-163
- Rocha J.C., MacDonald A., Trefz F., (2013). Is overweight an issue in phenylketonuria? *Mol. Genet. Metab.*, 110, pp. S18-S24
- Rocha J.C., van Spronsen F.J., Almeida M.F., Soares G., Quelhas D., Ramos E., *et al.* (2012). Dietary treatment in phenylketonuria does not lead to increased risk of obesity or metabolic syndrome. *Mol. Genet. Metab.*, 107 (4), pp. 659-663
- Rocha J.C., van Spronsen F.J., Almeida M.F., Ramos E., Guimaraes J.T., Borges N., (2013). Early dietary treated patients with phenylketonuria can achieve normal growth and body composition. *Mol. Genet. Metab.*, 110, pp. S40-S43
- Rodriguez-Campos J., Escalona-Buendía H.B., Orozco-Avila I., Lugo Cervantes E., Jaramillo-Flores M.E., (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis, *Food Res. Int.*, 44 (1), pp. 250-258
- Rohsius C., Niemenak N., Elwers S., Ndoumou D.O., Lieberei R., (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents *J. Food Anal.*, 19, pp. 612-619
- Rojo-Poveda O., Barbosa-Pereira L., Zeppa G., Stévigny C., (2020). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential, *Nutrients*, 12 (4)
- Rose A.M., Grosse S.D., Garcia S.P., Bach J., Kleyn M., Simon N.E., Prosser L.A., (2019). The financial and time burden associated with phenylketonuria treatment in the United States *Mol. Genet. Metab. Rep.*, 21, Article 100523
- Rousseau D., (2007). The microstructure of chocolate. D.J. McClements (Ed.), *Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods*, Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 648-690
- Rusconi, M. and Conti, A., (2010). *Theobroma cacao* L., the food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. Review. *Pharmacological Research*, 61, 5–13.
- Sakac M., Torbica A., Sedej I., Hadnadev M., (2011). Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International*, 44: 2806- 2813.
- Santander M.M., Rodríguez C.J., Vaillant F.E., Escobar S.P., (2019). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation, *Food Science and Nutrition*, 21pp. 1-21, 10.1080/10408398.2019.1581726 Google Scholar
- Sârbu I., Csutak O., (2019). The microbiology of cocoa fermentation, Caffeinated and Cocoa Based Beverages, 8, pp. 423-446, 10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1

- Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, Chang TMS, Scriver CR., (1999). A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Aca Sci* 96(5):2339–44.
- Schuck P.F., Malgarin F., Cararo J.H., Cardoso F., E.L. Streck, Ferreira G.C., (2015). Phenylketonuria pathophysiology: on the role of metabolic alterations. *Aging Dis.*, 6, pp. 390-399
- Schulz B., Bremer H.J., (1995). Nutrient intake and food consumption of adolescents and young adults with phenylketonuria. *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992), 84 (7), pp. 743-748
- Schwan R., Wheals A., (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 , 205-221
- Scriver C.R., Kaufman S., (2001). Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, W.S. Sly (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York.
- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC (1995) The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edn. New York: McGraw-Hill, 1015–1075
- Seçkin, Y. ve Erturan, N. 1999. Fenilketonürlü Çocukların Ailelerinde Teşhis Tedavi Sürecinde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikleri Etkileyen Faktörler. *M.Ü. Atatürk Eğitim Fakültesi Eğitim Bilimleri Dergisi*, 11: 285-300.
- Serpen, A., & Gökmen, V. (2009). Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 589–595
- Shadwell, N., Villalobos, F., Kern, M., & Hong, M.Y., (2013). Blooming reduces the antioxidant capacity of dark chocolate in rats without lowering its capacity to improve lipid profiles. *Nutrition Research*, 33, 414-421.
- Shafi F., Reshi M., Aiman B. and Iqra B., (2018). CHOCOLATE PROCESSING, *International Journal of Advanced Biological Research*, vol.8 (3) , pp 408- 419
- Sheldon, R. A., van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society of Review*, 42(15), 6223-6235.
- Shrime MG, Bauer SR, McDonald AC, Chowdhury NH, Coltart EM, Ding EL., (1988). Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta analysis of short-term studies. *J Nutr* 2011;141:1982
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152-178.
- Sjöström E., (1993). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Second Edition, Academic Press, San Diego- California 92101-4495 USA, 293 p

- Sladkevicius E, Pollitt R.J., Mgadmi A., Guest J.F., (2010). Cost effectiveness of establishing a neonatal screening programme for phenylketonuria in Libya, *Appl. Health Econ. Health Policy* 8 ,407–420.
- Smith I., Cook B., Beasley M., (1991). Review of neonatal screening programme for phenylketonuria, *BMJ* 303 , 333–335.
- Smith J.E., (2004). *Biotechnology*. Cambridge University Press, New York, p.271.
- Soltanizadeh N. and Mirmoghhtadaie L., (2014). Strategies Used in Production of Phenylalanine-Free Foods for PKU Management., *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, Volume13, Issue3, Pages 287-299
- Spizzirri U.G., Ieri F., Campo M., Paolino D., Restuccia D., Romani A., (2019). Biogenic amines, phenolic, and aroma-related compounds of unroasted and roasted cocoa beans with different origin Foods, 8 , p. 306
- Stapley, A.G.F., Tewkesbury, H., Fryer, P.J., (1999). The effects of shear and temperature history on the crystallisation of chocolate. *Journal of American Oil and Chemical Society* 76, 677–685
- Steinberg F.M., Bearden M.M., Keen C.L., (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health , *Journal of the American Dietetic Association*, 103 (2), pp. 215-223
- STRISCIUGLIO, P. and CONCOLINO, D. 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, 4: 1007-1017.
- Sullivan JE, Chang P., (1999). Review: emotional and behavioral functioning in phenylketonuria. *J Pediatr Psychol* 24(3):281–99.
- Tabak, A. (2008). Endokrinoloji ve Metabolizma Polikliniğimizden Takipli Hastalarda Akraba Evliliği Sıklığı ve Akraba Evliliğini Etkileyen Faktörler.
- Tacias-Pascacio V.G., Morellon-Sterling R., El-Hocine S., Tavano O.L., Fernandez-Lafuente R., (2020). Use of alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165 , pp. 2143-2196.
- Taiz L. ve Zeiger E. (2002). *Bitki Fizyolojisi*. (3 baskı, s. 484). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., Yayıncılar.
- Talbot, G., (2012). Cocoa Butter and Related Compounds || *Chocolate and Cocoa Butter-Structure and Composition*, pp 1-33
- Tanzer, F. 2007. Maternal Fenilketonüri Sendromu. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 29 (4): 179-184.
- Taşdemir Y., Gölge E., (2020)., Fenilketonürlü hastalar için fenialanın içeriği azaltılmış soya sütü üretimi. *Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*
- Teng YH, Sung CS, Liao WW, Kao SC. General Anesthesia for Patient with Homocystinuria: A Case Report. *Acta Anaesthesiol Sin* 2002;40:153-6
- TGKY-ÇÇÜT., (2003). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Çikolata ve Çikolata ürünleri Tebliği, Tebliğ No: 2003/23, Resmi Gazete Tarih ve No: 17.07.2003–25171

- The Science of Chocolate, Royal Society of Chemistry, Cambridge , pp. 80-102
- Thomas.M.Ball., Anne L.W. (SACN). (2018).Feeding in the First Year of Life.Public Health, England.
- Todorovic V., Milenkovic M., Vidovic B., Todorovic Z., Sobajic S., (2017). Correlation between antimicrobial, antioxidant activity, and polyphenols of alkalized/non-alkalized cocoa powders. Journal of Food Science, 82 , pp. 1020-102.
- Tokatlı A. (2006) Doğuştan Metabolik Hastalıklara Tanısal Yaklaşım. Güncel Pediatri 4, 133-8.
- Toker O.S., Konar N., Palabiyik I., Rasouli Pirouzian H, Oba S., Polat D.G., Poyrazoglu E.S., Sagdic O., (2018), Formulation of dark chocolate as a carrier to deliver eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effects on product quality, Food Chem., 254, pp. 224-231.
- Tokuşoğlu Ö., (2015) Kakao, Çikolata ve Çikolatalı Ürünler Bilimi Teknolojisi, Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Manisa.215
- Toro-Vazquez J.F., Pérez-Martínez D., Dibildox-Alvarado E., Charó-Alonso M., Reyes-Hernández J., (2004).Rheometry and polymorphism of cocoa butter during crystallization under static and stirring conditions. J. Am. Oil Chem. Soc., 81, pp. 195-203. Erişim Tarihi: 06.01.2022
- Trunzo, R. et al.(2015) Phenylalanine hydroxylase deficiency in south Italy: Genotype– phenotype correlations, identification of a novel mutant PAH allele and prediction of BH4 responsiveness. Clinica Chimica Acta, 450: 51–55.
- Tsai P.J., Delva L., Yu T.Y., Huang Y.T., Dufosse L., (2005). Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. Food Research International, 38: 1059-1065.
- Uskun, E. 2001. Akraba Evlilikleri. <http://www.ttb.org.tr/sted/sted0201/4.html>. [Son Erişim Tarihi: 17.08.2015]
- Utomo B., Prawoto A.A., Bonnet S., Bangviwat A., Gheewala S.H., (2016).
- Valenzuela Mariefel B., Jones Christopher W., Agrawal Pradeep K., (2006). Batch Aqueous-Phase Reforming of Woody Biomass, Energy & Fuels 20, 1744-1752.
- Valterney L.D., Eliete S. B., Adriana S.F., Maria Beatriz A.G., (2021). Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. Journal of Food Composition and Analysis. Volume 97, April, 103776,pp 1-9.
- van Spronsen F.J., Blau N., Harding C., Burlina A., Longo N., Bosch A.M., (2021). Phenylketonuria. Nat. Rev. Dis. Prim.,7 (1), pp. 1-19
- van Wegberg A.M.J., MacDonald A., Ahring K., *et al.*(2017).The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment Orphanet. J. Rare Dis., 12 (1) , p. 162
- Velioğlu S (2006). Antioksidanlar (Ders notları, yayınlanmamış). A.Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara.
- Velioğlu, S., (1987). Gıdalarda Renk Ölçme İlke ve Sistemleri, Gıda, 12(6):409-416.

- Vockley J., Andersson H.C., Antshel K.M., et al (2014),. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline, *Genet Med.*, 16 (2) , pp. 188-200
- Voigt J., Janek K., Textoris-Taube K., Niewianda A., Wöstemeyer J.,(2016). Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components, *Food Chemistry*, 192 (1), pp. 706-713
- Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H.,(2007). Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metabol* 92(1):63–70.
- Walter JH, White FJ, Hall SK, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria?. *Lancet* 2002; 360: 55–57.
- Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. 2013. *Chocolate in Health and Nutrition*. New York, Humana Press.
- Web- 1. (2016, Kasım 3). Retrieved from National PKU Alliance Web sitesi: npku.org/Education/About-PKU, About PKU.
- Whitlock B.A., Baum D.A., (1999). Phylogenetic relationships of theobroma and herrania (sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene vicilin. *Systematic Botany*, 24, pp. 128-138
- Wiharto M., (2017). Characterization of Cacao Fruit Skin for Active Carbon and Green Chemicals. *JKPK (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia)* 21- 66
- Wilken, L. R., Nikolov, Z. L. (2016). Aqueous fractionation of dry-milled corn germ for food protein production. *Emerging and traditional technologies for safe. Healthy and Quality Food*, 443-461.
- Wim, J. Q., (2006). *Bacterial Enzymes* (M. DWORKIN editör). The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology, Third Edition, Springer Science and Business Media Inc., New York, p.777-796.
- Yamashita Y., Okabe M., Natsume M., Ashida H., (2019),Cacao liquor procyanidins prevent postprandial hyperglycaemia by increasing glucagon-like peptide-1 activity and AMP-activated protein kinase in mice, *J Nutr Sci*, 8, p. e2
- Yano S, Moseley K, Azen C., (2012). Large neutral amino acidsupplementation increases melatonin synthesis in phenylketonuria: a newbiomarker. *J Pediatric* 162(5):999–1003
- Yanus R.L., Sela H., Borojovich E.J.C., Zakon Y., Saphier M., Nikolski A., Karpas Z., (2014). Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study *Talanta*,119, pp.1-4.
- Yazgan, U., (2003). Fenilketonüri. *Eczacı Dergisi*, 4: 25
- Zerjav Tansek M., Groselj U., Angelkova N., Anton D., Baric I., Djordjevic M., et al. (2015). Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet J. Rare Dis.*, 10, p. 68.

- Zhang D., qin, Mu, T. hua, Sun, H. nan, Chen, J. wang, & Zhang, (2017). Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. *Int J Food Prop*, 20(9), 2113–2127.
- Zhang Y.L. , Li S., Yin C.P., Jiang D.H., Yan F.F., Xu T., (2012). Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Food Chem.*, 135, pp. 304-308.
- Zheng, H.Z., Hwang, I.W., Chung, S.K. (2009). Enhancing Polyphenol Extraction from Unripe Apples by Carbohydrate-Hydrolyzing Enzymes, *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(12): 912-919.
- Zschoche J. Disorders of Intermediary Metabolism. In: Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL (eds). *Inherited Metabolic Disease*, 1 st ed. Berlin, Springer, 2010: 3-6
- Żyżelewicz, D., Krysiak, W., Budryn, G., Oracz, J., & Nebesny, E. (2014). Tocopherols in cocoa 16 butter obtained from cocoa bean roasted in different forms and under various process 17 parameters. *Food Research International*, 63, 390–399.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Könül MEHDİZADE

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Gıda Mühendisliği	2022
Lisans	Azerbaycan Devlet İktisat Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Gıda Mühendisliği	2016
Lisans	Bakü Temel Tıp Fakültesi/ Hemşirelik	/ 2011
Lise	Bakü №49 intellektüel Lisesi	/ 2008

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2022	Oğuz Gıda San. ve Tic. A. Ş	Ar-Ge mühendisi
2020	Gilan Holding Fabrikası	Staj
2019	Azerbaycan Gıda Güvenliği Bakanlığı	Araştırma Görevlisi
2016-2018	Bakü Kaspi TM.MMC	Müştereri İlişkileri Yöneticisi

YABANCI DİL

Rusca, İngilizce