

GIDALARIN VE BİYOLOJİK MADDELERİN SÜPERKRİTİK AKIŞKANLARLA İŞLENMESİ: II. KRİSTALİZASYON, EKSTRÜZYON, MİKROBİYAL İNAKTİVASYON

SUPERCRITICAL FLUID PROCESSING OF FOOD AND BIOMATERIALS: II. CRYSTALLIZATION, EXTRUSION, MICROBIAL INACTIVATION

Meryem Esra YENER

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06531, ANKARA

ÖZET: Gıdaların ve biyolojik maddelerin süperkritik akışkanlar ile işlenmesi, fonksiyonel ve yüksek değerli ürünler elde edilmesi için önemli bir araçtır. Ekstraksiyon, fraksiyonasyon ve reaksiyonun yanı sıra, kristalizasyon ve ekstrüzyon ile değerli ürünler elde edilebilmekte, mikrobiyal inaktivasyon yapılabilmektedir. Bu derleme, son gelişmeleri, potansiyel uygulamaları ve araştırma gereksinimlerini içermektedir.

ABSTRACT: Supercritical fluid processing of food and biomaterials is an important tool in obtaining high value products. Besides extraction, fractionation, and reaction, valuable products are obtained by crystallization, extrusion as well as microbial inactivation. This review includes the recent developments, potential applications and future needs.

GİRİŞ

Süperkritik akışkanların en belirgin özelliği organik maddeler için güçlü çözücüler olmaları ve bu çözücü gücün yoğunluklarındaki (sıcaklık ve basınçlarındaki) değişiklikler ile büyük ölçüde değişmesidir. Bundan önceki bölümde, (YENER, 2000) bu özelliklerinden yararlanılarak süperkritik akışkanların, gıdaları ve biyolojik maddeleri ekstraksiyon (SFE), fraksiyonasyon (SFF), ve reaksiyon (SFR) yolu ile kullanışlı ve değerli endüstriyel ürünlere dönüştürmede bir teknolojik yaklaşım olarak kullanıldığının örnekleri verilmiştir. Bu bölümde de süperkritik akışkanların özellikle kristalizasyon ve ekstrüzyon yolu ile istenen morfoloji ve parça büyüklüğüne sahip, fonksiyonel ve değerli ürünler üretilmesinde kullanılmasının örnekleri verilecektir. Bu alan çok daha araştırmaya gereksinim duymakla beraber, gelişmeye açık olup değerli ürünler üretilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir.

Süperkritik Akışkanlarla Kristalizasyon-Kontrollü Tahliye Sistemleri

Kontrollü tahliye sistemleri aktif maddenin bir polimer matrisi içine dağıtılması ile gerçekleşir. Bunun için aktif madde bir organik çözücünün içinde çözülür ve polimer ile temas ettirilir. Polimer şişer ve aktif madde polimer içine yayılır. Bu metodun dezavantajı sonunda organik çözücünün ortamda ayrılması gereksinimidir ki bu pratik olarak hiç bir zaman gerçekleştirilemez. Bu nedenle süperkritik akışkanların kontrollü tahliye sistemlerinin üretilmesinde kullanılması geleneksel metotlara göre mükemmel bir alternatiftir. Dar parça büyüklüğü dağılımına sahip, morfolojisi bir örnek kristal ve tozlar ecza ürünleri ve ilaç dağıtım sistemleri olarak kullanılırlar. Bu alanda da süperkritik akışkanlar geleneksel metotlara rakiptir ve değişik süreçler uygulanabilir:

1. Süperkritik çözücülerin hızlı genleşmesi (*Rapid Expansion of Supercritical Solvents, RESS*):

Süperkritik akışkanların çözücü gücü yoğunluklarının kuvvetli bir fonksiyonu olup, basınçtaki ufak değişiklikler ile büyük değişiklikler elde edilebilir. Doymuş süperkritik çözücünün hızlı genleşmesi (basıncının düşürülmesi) çözücü gücünün azalmasına ve dolayısı ile içinde çözünen maddenin çökmesine neden olur. Bu genleşme bir meme veya kılcal tüp yardımı ile çok hızlı olursa (<10-5 saniye), yüksek aşırı doymuşluk düzeyleri, küçük parçacıklar ve muntazam parça büyüklüğü dağılımı elde edilebilir. Prensipite basıncın düşürülmesi, sıcaklığın düşürülmesi ile aynı işlevi görmesine rağmen aralarındaki farklılık çözeltideki değişikliğin meydana gelme hızıdır ki, bu da süperkritik akışkanların sıkışıklık özelliğinin sağladığı bir avantajdır. Parçacıkların şekli ve

parça büyüklüğünü etkileyen parametreler, genişleme öncesi sıcaklık ve basınç, genişleme sonrası sıcaklık ve basınç (genişleme öncesi ve sonrasındaki çözücü yoğunluğu), meme çapı (veya kılcal tüplerde, tüp boyunun çapına oranı), ve süperkritik çözeltinin konsantrasyonudur (MOHAMMED ve ark., 1989). RESS in en enterasan potansiyel uygulamalarından biri, tane ufaltmaktır (TOM ve DEBENEDETTI, 1991). Bu amaçla genellikle ezme ve öğütme gibi mekanik veya sıvı çözücülerden kristalleştirme gibi denge kontrollü süreçler kullanılır. Fakat bir çok madde mekanik yollarla işlenemeyecek kadar şoka hassas, ısı ve/veya kimyasal (hava ile temasla) bozulmaya yatkındır. Sıvı çözücülerle kristalleştirmede ise çözünenin çözücü ile kirlenmesi bir dezavantajdır ve genellikle tek dağılımlı parçacıklar elde etmek mümkün değildir. RESS, daha çok steroid (ALESSI ve ark., 1996), kolesterol düşürücü Lovastatin gibi ilaç maddeleri, poly(L-laktik asit) gibi bio-parçalanabilir polimerik maddeler veya bunların karışımlarının (TOM ve ark., 1993) kristalizasyonunda kullanılmakla beraber β-karoten (CHANG ve RANDOLPH, 1989) ve benzoik asit (TAVANA ve RANDOLPH, 1989) gibi gıda katkı maddelerinin kristalizasyonu için de kullanılmıştır. Ham lesitinin işlenmesi, soya lesitinin yağdan arındırılması yüksek kaliteli monogliseridlerin elde edilmesini amaçlayan SFE ve SFF süreçlerinin sonundaki hızlı genişleme sonucunda çok ince toz lesitin ve monogliserid stearat tozları elde edilmiştir (PETER, 1996). Organik maddelerin kristalleştirilmesinde genelde süperkritik karbon dioksit kullanılmakla beraber, etilen, (CHANG ve RANDOLPH, 1989) propan (PETER, 1996) gibi çözücüler de kullanılmıştır.

2. Anti-çözücüler kullanarak kristalizasyon: RESS uygulamaları kristalize edilmek istenen maddenin süperkritik akışkan içindeki çözünürlüğü ile sınırlıdır. Protein gibi bir çok polar biyolojik madde süperkritik akışkanlar (genelde karbon dioksit) içinde çözünür değildir. Bu durumda, geleneksel organik (veya inorganik) çözücüler içinde çözünen madde ile hazırlanan çözelti, süperkritik akışkan ile temas ettirilerek kristalizasyon sağlanabilir. Organik çözücü süperkritik akışkan içinde çözünürken, süperkritik akışkan içinde çözünür olmayan çözünen çökeler. Çökelen parçacıkların büyüklüğü ve morfolojisi, çözeltinin hacımsal genişlemesine ve süperkritik akışkanın çözeltiye eklenme hızına bağlıdır. Bu prensiple değişik süreçler uygulanabilir (KIKIC ve SIST, 1998):

a) Gaz anti-çözücü (*Gas Antisolvent, GAS*): Bu kesikli süreçte, süperkritik anti-çözücü çözeltinin içine ilave edilir.

b) Sıkıştırılmış anti-çözücü ile çökeltme (*Precipitation with Compressed Antisolvent, PCA*): Çözelti bir memeden sıkıştırılmış anti-çözücünün üzerine püskürtülür. Sıvı veya süperkritik anti-çözücüler kullanılabilir.

c) Aerosol çözücü ekstraksiyon sistemi (*Aerosol Solvent Extraction System, ASES*): Çözelti ve anti-çözücü sürekli eşyönlü akım ile temas ettirilir.

d) Süperkritik anti-çözücü çökeltmesi (*Supercritical Antisolvent Precipitation, SAS*): Çözelti ve anti-çözücü sürekli karşı akım ile temas ettirilir.

Bu kristalizasyon tekniklerinin hepsi RESS tekniğini tümler nitelikte olup, organik çözücülerden arınmış, dar parçacık büyüklüğü dağılımı olan mikro-parçacıklar ve tozlar elde etmek için ümit vaat edicidir. GAS, peptid ve protein tozları elde edilmekte kullanılmış ve elde edilen ürünlerin geleneksel püskürtmeli kurutma, öğütme ve liyoflizasyon metodları ile elde edilenlere göre çok daha küçük ve biyolojik olarak aktif oldukları gözlenmiştir (YEO ve ark., 1993). Bu uygulamaların yanı sıra GAS, sitrik asitin (SHISHIKURA ve ark., 1992) ve proteinlerin (WINTERS ve ark., 1999) seçici olarak kristalizasyonu ile saflaştırılmalarında kullanılmıştır. β-karoten, RESS in yanı sıra GAS kullanılarak da kristalleştirilebilir (CHANG ve RANDOLPH, 1990). SAS ile de değişik protein tozları elde edilmiştir (WINTERS ve ark., 1996).

3. Süperkritik çözücülerle aşılama (*Impregnation with a Supercritical Solution, SSI*): Bu metod, kontrollü tahliye sistemleri için organik maddelerin bir polimer ile kapsüllemesi (encapsulation) amacı ile kullanılır. Kapsüllemek istenen organik madde süperkritik şartlarda çözücü ve polimer arasında paylaşılır. Organik maddenin polimerin içindeki paylaşımı daha fazla olmalıdır. Paylaşım tamamlanınca süperkritik çözücü ortamdaki çekilir ve kapsülleme gerçekleştirilir. Bu konuda daha çok patentli uygulamalar mevcuttur (KIKIC ve SIST, 1998).

Gıda malzemelerinin kontrollü tahliyesi için kapsüllemesi (RISCH, 1995) gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda sistemlerinde korunması, izole edilmesi veya kontrollü tahliyesi istenen her malzeme kapsüllenebilir. Bunlar arasında asitler, yağlar, enzimler, sentetik tatlandırıcılar, vitaminler, mineraller, su, tat, renk, koku ve kabartma maddeleri sayılabilir. Kapsülleme için kullanılan maddeler ise, yağlar (özellikle lesitin gibi fosfolipidler), şekerler, ve doğal polimerlerdir (KING, 1995).

Süperkritik akışkanların, gıda malzemelerinin kristalleştirilmesi ve kontrollü tahliye sistemlerinin oluşturulmasında kullanılması, araştırmaya açık geniş bir alandır. Çözücü olarak süperkritik karbon dioksitin kullanılacağı durumlarda, tahliyesi kontrol edilmek istenen gıda malzemesi ve kapsülleme maddesinin bu ortamda çözünür (yağ sever) olması gerekir. Fosfolipidler ve yağ sever modifiye nişastalar kapsül maddesi olarak iyi birer aday olabilirler. Diğer yenibilir (food grade) polimerlerin ve karbon dioksit alternatif çözücülerin araştırılması da mümkündür. Bu sayede pek çok yüksek değerli "tasarlanmış" ürün elde edilebilir. Bu süreçlerin SFE ve SFF ile başlanması mümkün olabilir.

Süperkritik Akışkanlarla Ekstrüzyon (Supercritical Fluid Extrusion, SCFX)

Ekstrüzyon, gıda sanayinde çok yönlü kullanılan endüstriyel bir süreçtir. Dünyada bu süreçle üretilen gıda ve yem ürünlerinin sayısı gittikçe artmaktadır. Bunlar arasında, çerezler, kahvaltılıklar, makarnalar, hayvan mama ve yemleri sayılabilir. Ekstrüzyon genellikle nişasta ve protein içerikli ham maddelerin su ve diğer katkı maddeleri ile ekstruderde yüksek sıcaklık, basınç ve kayma ile karıştırılmasını içerir. Pişmiş ürün bir kalıptan çekilir. Ürün kalıptan çevre basıncına çıkarken, sıkıştırılmış su ani olarak buhara dönüşür ve böylelikle ürün şişer. Düşük su içeriği, yüksek sıcaklık ve yüksek kayma sonucu nişasta molekülleri parçalanabilir, böylece üründe daha fazla şişme meydana gelerek, düşük yoğunluklu, yüksek su çözünürlük göstergesi (water solubility index, WSI) ve yüksek su emme göstergesi (water absorbance index, WAI) olan ürünler elde edilir ki bunlar özellikle süt ile karıştırılan kahvaltılıklarda istenmeyen özelliklerdir. Süreç sırasında Maillard reaksiyonları meydana gelebilir. Sert süreç koşulları yüzünden ısı ve kaymaya hassas tat, renk veren maddeler, vitamin ve proteinler süreçten sonra ürüne eklenirler.

Yüksek basınç gerektiren ekstrüzyon ve süperkritik akışkan teknolojisinin nitelikleri birleştirilerek geleneksel ekstrüzyon sürecinin sorunlarına zarif çözümler bulunabilir. SCFX, akışkan fazında çözünmüş mikro besinler, tat ve renk maddeleri içeren süperkritik akışkanın (tercihan karbon dioksit) konfigürasyonu değiştirilmiş ekstruder içinde pişirilmiş (jelatinize edilmiş) ve 100°C'ın altına soğutulmuş eriyik içine enjekte edilmesini içerir. SCFX, içinde belli bir konsantrasyonda süperkritik (veya subkritik) karbon dioksit içeren sıkıştırılmış viskoelastik eriyiği atmosferik basınç ortamına taşır, ve kalıptan çıkan eriyik üç boyutlu şişer. Su genişlemesi ile şişirmenin tersine, SCFX te faz değişimi yoktur. Hidrodinamik etkenlerle çekirdeklenen kabarcık, karbon dioksitin konsantrasyon farkı ile çevredeki eriyikten yayılması ile "difüzyon kontrollü" olarak genişler (MULVANEY ve RIZVI, 1993). Bu açıklamaya göre, eriyik viskozitesi ve gerilimdeki artış kabarcık büyüme hızını azaltırken, eriyik elastikliği, karbon dioksitin konsantrasyonu ve difüzyon katsayısının artması kabarcık büyüme hızını artırır. Bu özelliklerin kontrol edilebileceği süreç parametreleri ise, eriyik su içeriği, kalıp basıncı (akış kısıtlayıcısı) ve karbon dioksit enjeksiyon basıncıdır. Bu parametrelerin diğer ekstrüzyon parametreleri ile nasıl etkilendiği de incelenmelidir.

Bu yolla düşük ve orta yoğunlukta, sert, düşük su emme göstergesine sahip ürünler elde edilebilir. MULVANEY ve RIZVI'nin (1993) mısırın SCFX ile işlenmesi sonucu elde ettikleri kahvaltılıkların yüzeylerinin, geleneksel ekstrüzyon ile elde edilen kahvaltılıklara göre çok daha düzgün olduğu gözlenmiştir. Bu, kalıpta daha az kayma gerilimi olmasına ve/veya ürün yüzeyinde ani su genişlemesi olmamasına bağlanabilir. Kahvaltılıkların yan kesitleri incelendiğine ise SCFX ile işlenen ürünlerin; geleneksel yolla işlenenlerin tersine; yoğun, küçük ve düzgün hücreler, ve kalın hücre duvarlarına sahip oldukları gözlenmiştir. Pişirilmemiş irmik ile yapılan SCFX çalışmalarında gözeneklerin yapısı ve/veya karbon dioksit ile etkileşim sonucu daha açık renkli makarna ürünleri elde edilmiştir (RIZVI ve ark., 1995). Şekerlemelerde ise eriyiğin çatlaması sonucu pütürlü yüzeyler gözlenmiştir. SCFX ile elde edilen ürünlerdeki problemi şişen köpüğün kendi ağırlığı ile

çökmesi ve çok daha yoğunlaşmasıdır. Çökmeyi azaltmak için peynir altı suyu tozu, mısır lifi, dirençli nişasta gibi doku düzenleyiciler kullanılmıştır (SOKHEY ve ark., 1996). Bu ürünlerde yoğunluk ve morfoloji düzelmiş süt kaynaklı maddelerinin kullanıldığı ürünlerde kararma az görülmüştür.

Bu araştırmalar SCFX in yeni nesil ürünler üretmek için büyük bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. Bunlar arasında, aynı zamanda tatlandırılan ve mayalanan ekmeği tipi ürünler, birlikte ekstrüzyon (co-extrusion) ile içleri doldurulmuş hububat bazlı ürünler sayılabilir. Enzim hidrolizine alternatif olarak, ekstruder içinde nişasta hidrolizine uygun, yüksek sıcaklık ve kayma, düşük pH ortamları yaratmak potansiyelleri arasındadır ki bu da nitelendirilmiş nişasta unları üretmek için kullanılabilir (RIZVI ve ark., 1995).

Ekstrüzyon, gıda malzemelerinin kapsüllenmesinde kullanılan metodlardan bir tanesidir (RISCH, 1995). ISS kullanılmayacağı, nişasta bazlı kapsül malzelerinin tercih edildiği durumlarda kontrollü tahliyesi istenen gıda malzemesi SCFX ile kapsüllenebilir.

Süperkritik Akışkanlarla Mikrobiyal İnaktivasyon

Pek çok işlevinin yanı sıra, süperkritik karbon dioksitin, istenmeyen enzimlerin inaktivasyonunda ve patojenik mikroorganizmaların kontrolünde kullanılabilme olasılığı da araştırılmıştır.

Portakal suyunun süperkritik karbon dioksit ile temasında, karbon dioksitin su ile birleşmesi ile geçici olarak pH düşmekte, bu faktör basınç, ve kayma ile de birleşince pektinesteraz enzimi inaktive olmaktadır (ARREOLA ve ark., 1994). Bu süreç, portakal suyunun kalitesini koruyarak, renk ve bulanıklığını düzeltilmiş ve mikroflorasını da azaltmıştır. Böylece pektinesterazın ısı ile inaktive edilmesi sırasında oluşan kötü kokular da ortadan kaldırılmıştır. Süperkritik karbon dioksit kullanılarak, mantar ve istakozdan izole edilen polifenol oksidaz enzimi de sulu ortamlarda inaktive edilebilmiştir (BALABAN ve ark., 1991). *Listeria* ile kirletilmiş karides, yumurta sarısı, portakal suyu, ve *Salmonella* ile kirletilmiş tavuk eti, yumurta sarısı ile yapılan çalışmalarda süperkritik karbondioksitin bu bakterileri en az %95 oranında öldürdüğü görülmüştür (WEI ve ark., 1991).

Bu mikrobiyal etki, pH azalması ile enzimlerin inaktive olması, ve/veya fosfolipidler gibi bazı iç hücrel maddelerin ekstraksiyonu ile açıklanabilir. Mikrobiyal inaktivasyon sürecindeki parametreler, basınç, sıcaklık, ortamın pH sı, uygulama süresi ve en önemlisi ortamın su aktivitesidir. Su aktivitesi düşük olan sistemlerde süperkritik karbon dioksitin etkisi de azalmaktadır. Diğer dezavantajlar ise, dokudan suyun, karoten gibi renk maddelerinin ekstrakt olabilmesidir. Tavuk eti ve karides ile yapılan çalışmalardan sonra bu gıda maddelerinde "pişmiş" görünümü gözlenmiştir.

Süperkritik akışkanların diğer meyve suları ve gıda sistemlerindeki mikrobiyal ve fiziksel etkileri araştırılmaya açıktır.

KAYNAKÇA

- ALESSI, P., CORTESI, A., KIKIC, I., FOSTER, N.R., MACNAUGHTON, S.J. 1996. Particle production of steroid drugs using supercritical fluid processing. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35(12):4718-4726.
- ARREOLA, A.G., BALABAN, M.O., MARSHALL, M.R., WEI, C.I., PELOW, A.J., CORNELL, J.A. 1994. Supercritical carbon dioxide processing of orange juice: effects on pectinesterase, microbiology and quality attributes. "in *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Ed. S.S.H. Rizvi", Blakie Academic & Professional, London, p. 133-154.
- BALABAN, M., PEKYARDIMCI, S., MARSHALL, M., ARREOLA, A., CHEN, J.S., WEI, I. 1991. Effects of high pressure CO₂ treatment on enzyme activity in model systems and orange juice. "in *Proceedings of the 2nd International Symposium on Supercritical Fluids*, Ed. M.A. McHugh", Johns Hopkins University, Baltimore, MD, p.114-117.
- CHANG, C.F., RANDOLPH, A.D. 1989. Precipitation of microsize particles from supercritical fluids. *AIChE J.* 35(11):1876-1882.
- CHANG, C.F., RANDOLPH, A.D. 1990. Solvent expansion and solute solubility predictions in gas-expanded liquids. *AIChE J.*, 36(6):939-942.
- KIKIC, I., SIST, P. 1998. Applications of supercritical fluids to pharmaceuticals: Controlled drug release systems. "presented in NATO ASI, *Supercritical Fluids-Fundamentals and Applications*", Kemer, Turkey.

- KING, A.H. 1995. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. "In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, Eds. S.J. Risch, G.A. Reineccius", ACS Symposium Series 590, American Chemical Society, Washington DC, p. 26-41.
- MOHAMMED, R.S., DEBENEDETTI, P.G., PRUD'HOMME, R.K. 1989. Effects of process conditions on crystals obtained from supercritical mixtures. *AIChE J.*, 35(2):325-328.
- MULVANEY, S.J. AND RIZVI, S.S.H. 1993. Extrusion processing with supercritical fluids. *Food Tech.*, 47(12):74-82.
- PETER, S. 1996. Supercritical fractionation of lipids. "in Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry, Eds. J.W. King, G.R. List", AOCS Press, Champaign, Illinois, p. 65-100.
- RISCH, S.A. 1995. Encapsulation: overview of uses and techniques. "in Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, Eds. S.J. Risch, G.A. Reineccius", ACS Symposium Series 590, American Chemical Society, Washington DC, p. 2-7.
- RIZVI, S.S.H., MULVANEY S.J., AND SOKHEY A.S. 1995. The combined application of supercritical fluid and extrusion technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6:232-240.
- SHISHIKURA, A., TAKAHASHI, H., HIROHAMA, S., ARAI, K. 1992. Citric acid purification process using compressed carbon dioxide. *J. Supercritical Fluids*, 5(4):303-312.
- SOKHEY, A.S., RIZVI, S.S.H, AND MULVANEY, S.J. 1996. Application of supercritical fluid extrusion to cereal processing. *Cereal Foods World*, 41(1):29-34.
- TAVANA, A., RANDOLPH, A.D. 1989. Manipulating solids CSD in a supercritical fluid crystallizer: CO₂-benzoic acid. *AIChE J.*, 35(10):1625-1630.
- TOM, J.W, DEBENEDETTI, P.G. 1991. Particle formation with supercritical fluids-a review. *J. Aerosol Sci.*, 72(5):555-584.
- TOM, J.W., LIM, G.B., DEBENEDETTI, P.G., PRUD'HOMME, R.K. 1993. Applications of supercritical fluids in controlled release of drugs. "in Supercritical Engineering Science: Fundamentals and Applications, Eds. E. Kiran, J.F. Brennecke", ACS Series 514, ACS, Washington DC, p. 238-257.
- WEI, C.I., BALABAN, M.O., FERNANDO, S.Y. AND PELOW A.J. 1991. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* and *Salmonella*. *J. Food Protection*, 54(3):189-193.
- WINTERS, M.A., KNUTSON, B.L., DEBENEDETTI, P.G., SPARKS, H.G., PRYBYCIEN, T.M., STEVENSON, C.L., PRESTRELSKI, S.J. 1996. Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide. *J. Pharm. Sci.*, 85(6):586-594.
- WINTERS, M.A., FRANKEL, D.Z., DEBENEDETTI, P.G., CAREY, J., DAVANEY, M., PRZYBYCIEN, T.M. 1999. Protein purification with vapor-phase carbon dioxide. *Biotech. Bioeng.*, 62(3):247-258.
- YENER, M.E. 2000. Gıdaların ve Biyolojik Maddelerin Süperkritik Akışkanlarla İşlenmesi: I. Estraksiyon, fraksiyonasyon, reaksiyon. *Gıda*, 25 (3): 203-211.
- YEO, S.D., LIM, G.B., DEBENEDETTI, P.G., BERNSTEIN, H. 1993. Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent. *Biotech. Bioeng.*, 41(3):341-346.