

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KUMRU VE BOYOZDA AKRİLAMİD

DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Gönül GÜVEN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÜREN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.01.00

Sunuş Tarihi: 02.08.2010

Bornova-İZMİR

Gönül GÜVEN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Kumru ve Boyozda Akrilamid Düzeylerinin Belirlenmesi.” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.08.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Ali ÜREN
Raportör Üye	: Prof. Dr. M. Kemal ÜNAL
Üye	: Doç. Dr. Neriman BAĞDATLIOĞLU

ÖZET**KUMRU VE BOYOZDA AKRİLAMİD DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

GÜVEN, Gönül

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÜREN

Ağustos 2010, 66 sayfa

Bu araştırmada LC-MS/MS cihazında, pratik, kesin ve doğru yeni bir akrilamid analiz yöntemi geliştirilmiştir. İç standart yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin kumru örneği için saptama limiti (LOD) 1,5 µg/kg, raporlama limiti (LOQ) 5,0 µg/kg olarak bulunmuştur.

Piyasadan temin edilen 20 adet kumru ve 20 adet boyoz örneğinde akrilamid analizi ilk kez gerçekleştirilmiştir. Kumru örneklerinde geri kazanım çalışması yapılmış ve geri kazanım %99,3 olarak bulunmuştur.

Kumru örneklerinin ortama akrilamid düzeyi 35,11 µg/kg bulunurken boyozda ortalama akrilamid düzeyi 42,48 µg/kg olarak bulunmuştur. Ayrıca kumru ve boyoz örneklerinde pH, nem, L*, a*, b*, indirgen şeker ve protein analizleri de yapılmış ve akrilamid miktarı ile pH, nem, L*, a*, b*, indirgen şeker ve protein konsantrasyonu arasında korelasyon araştırılmıştır. Kumru ve boyoz örneklerinin ikisinde de nem içeriği ve L*, a*, b* değerleri ile akrilamid düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Akrilamid, kumru, boyoz, LC-MS/MS

ABSTRACT

**DETERMINATION OF ACRYLAMIDE LEVELS
OF KUMRU AND BOYOZ**

GÜVEN, Gönül

Master Thesis in Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜREN

August 2010, 66 pages

In this reserch, a new practical, definite and true acrylamide analysis method at LC-MS/MS was developed. Internal standard technique was used. Limit of detection and limit of quantification of this method for kumru is 1,5 µg/kg and 5,0 µg/kg respectively.

20 samples of kumru and 20 samples of boyoz supplied from markets were analyzed to determine acrylamide levels for the first time. Recovery study was done on kumru samples and recovery rate was found as %99,3.

Average acrylamide level of kumru samples was found 35,11 µg/kg while average acrylamide level of boyoz samples was found 42,48 µg/kg. pH, moisture content, L*, a*, b*, reducing sugar and protein content of kumru and boyoz samples were also determined and correlation between acrylamide level and pH, moisture content, L*, a*, b*, reducing sugar content, protein content were investigated. For both kumru and boyoz samples a significant correlation was found between acrylamide level and moisture content and L*, a*, b*.

Keywords: Acrylamide, kumru, boyoz, LC-MS/MS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana değerli görüş ve katkılarıyla yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÜREN'e,

Tez projeme maddi destekte bulunan; İstanbul Halk Ekmek A.Ş., Unmaş Unlu Mamuller Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Uno), Ege Bölgesi Sanayi Odası (Unlu Mamuller Sanayi Destek Komitesi), Kareksan A.Ş., Veliöğlü Ekmek Gıda San. Ltd. Şti., T.K.B. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)' ne ve Sayın İbrahim ÖZGENÇ'e,

Çalışmakta olduğum İzmir İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü' ne ve proje arkadaşım Gıda Yüksek Mühendisi Esra ALPÖZEN'e,

Eğitimim için her türlü fedakarlığı gösteren, hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini hissettiğim değerli aileme ve her zaman yanımda hissettiğim canım babama,

Çok teşekkür ederim.

Gönül GÜVEN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Akrilamid.....	4
2.2. Gıdalarda Akrilamid Oluşumu	5
2.2.1. Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşumu	5
2.2.2. Akrolein Bileşiği Üzerinden Akrilamid Oluşumu	8
2.2.3. “3-APA” Bileşiği Üzerinden Akrilamid Oluşumu	9
2.2.4. Okside Olmuş Lipidler Üzerinden Akrilamid Oluşumu	10
2.3. Akrilamidin Oluştığı Gıdalar	10
2.4. Akrilamidin Sağlık Üzerine Etkisi.....	12
2.5. Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	15
2.5.1. İndirgen Şeker Miktarı	15
2.5.2. Amino Asitler	15
2.5.3. Yağlar	15

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.4. Karbonhidratça zengin ve proteince zengin matrisler	16
2.5.5. Gıdanın pH'sı.....	17
2.5.6. Gıdanın Nemi ve Su Aktivitesi	17
2.5.7. Agronomik ve Genetik Faktörler	17
2.5.8. Proses Parametreleri	18
2.6. Gıdalarda Akrilamid Analiz Yöntemleri	18
2.6.1. LC-MS/MS Yöntemi İle Akrilamid Analizi	19
2.6.2. GC, GC-MS, Yöntemi İle Akrilamid Analizi.....	20
2.7. Akrilamidle İlgili Yasal Mevzuat.....	21
2.8. Kumru.....	21
2.9. Boyoz.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.2. Metot	25
3.2.1. Akrilamid Analizi.....	25
3.2.1.1 Akrilamid Standartlarının Hazırlanması:.....	25
3.2.1.2. Akrilamid Analizi İçin Örnek Hazırlama	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1.3. Safılaştırma	27
3.2.1.4. Yöntemin Saptama Limitinin Belirlenmesi	27
3.2.1.5. Geri Kazanım Değerlerinin Belirlenmesi	27
3.2.1.6. Kromotografik Koşullar	27
3.2.2. Gerçekleştirilen Diğer Analizler	28
3.2.2.1. pH Analizi.....	28
3.2.2.2. Nem Analizi	29
3.2.2.3. Protein Analizi	29
3.2.2.4. İndirgen Şeker Analizi:	29
3.2.2.5. Renk Analizi	29
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. LC/MS-MS’de Akrilamid Analiz Sonuçları	31
4.1.1. Yöntem Validasyonu.....	33
4.1.1.1. Geri Kazanım Yüzdesinin Belirlenmesi.....	33
4.1.1.2. Yöntemin Saptama Limitinin Belirlenmesi	33
4.2. Kumru Analiz Sonuçları.....	33
4.2.1. Kumru Örneklerinde pH.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. Kumru Örneklerinde Nem	33
4.2.3. Kumru Örneklerinde Renk Değerleri; L*, a*, b*	34
4.2.4. Kumru Örneklerinde Protein.....	34
4.2.5. Kumru Örneklerinde İndirgen Şeker	34
4.2.6. Kumru Örneklerinde Akrilamid.....	36
4.3. Boyoz Analiz Sonuçları.....	43
4.3.1. Boyoz Örneklerinde pH.....	43
4.3.2. Boyoz Örneklerinde Nem	43
4.3.3. Boyoz Örneklerinde Renk Değerleri; L*, a*, b*	43
4.3.4. Boyoz Örneklerinde Protein	44
4.3.5. Boyoz Örneklerinde İndirgen Şeker.....	44
4.3.6. Boyoz Örneklerinde Akrilamid.....	46
5. SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR DİZİNİ	54
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Akrilamidin Yapısı.....	4
2.2. Maillard reaksiyonlarının oluşum mekanizması.....	6
2.3. Dekarboksile Olmuş Amadori Bileşiğinden ya da Asparaginin Dikarbonillerinden Akrilamid Oluşum Mekanizması	8
2.4. Akrolein üzerinden akrilamid oluşum mekanizması	9
2.5. Akrilamidin asparaginin deaminasyonu/dekarboksilasyonu ile oluşumu	10
4.1. Akrilamid standartları için çizilen kalibrasyon eğrisi	31
4.2. Akrilamid standardı ve D3 Akrilamide ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu.....	32
4.3. Glukoz ve fruktoz standardına ait HPLC kromotogramı	35
4.4. K8 kodlu kumruya ait indirgen şeker kromotogramı(glukoz, fruktoz).....	35
4.5. K7 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogram ve spektrumu	39
4.6. K9 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu	40
4.7. K14 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogram ve spektrum	41
4.8. K18 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu	42
4.9. Glukoz ve Fruktoz standartlarına ait HPLC kromotogramı	45
4.10. B10 kodlu boyoza ait glukoz ve fruktoz kromotogramı	45
4.11. B4 kodlu boyoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumlar	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. B7 kodlu boyoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumlar	49
4.13. B8 kodlu boyoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu.....	50
4.14. B9 kodlu boyoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Farklı Gıdaların Ortalama Akrilamid Düzeyleri.....	11
3.1. Akrilamid standartlarının hazırlanmasında kullanılan stok standart çözelti miktarları ve standartların konsantrasyonları.....	26
3.2. LC-MS/MS cihazında akrilamidden ve D3 akrilamidden oluşan iyonlar.....	28
4.1. Kumruda belirlenen akrilamid, % protein, glukoz, fruktoz, indirgen şeker, pH, % nem, L*, a*,b*	38
4.2. Boyozda belirlenen akrilamid, % protein, glukoz, fruktoz, indirgen şeker, pH, % nem, L*, a*,b*	47

1. GİRİŞ

Gıdaların işlenmeleri sırasında ısı işlemlere (pişirme, fırınlama, kızartma, kavurma, sterilizasyon) sıklıkla başvurulmaktadır. Ancak uygulanan yüksek sıcaklıklar gıdada toksik bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Gıdalara uygulanan ısı işlemler sonucunda oluşan kanserojenik / mutajenik bileşiklerin en önemlileri ; heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-alkil-N-nitrosamin bileşikleri ve 2002’de İsveç Ulusal Gıda Örgütünün yaptığı çalışmayla toksik olduğu ortaya çıkan akrilamiddir (Claeys et al., 2005a).

Akrilamid beyaz renkli kristal yapılı katı bir madde olup su, etanol ve aseton gibi polar çözücülerde iyi çözünürken, heptan gibi polar olmayan çözücülerde az miktarda çözünebilmektedir. Sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir (2155 g/l) (Friedman, 2003; Rice, 2005; Zhang & Zhang, 2007; Zhou et al. 2007). Poliakrilamid içme suyu ve atık sularda bulunan parçacık ve kirliliklerin uzaklaştırılmasında yararlanılan bir kimyasal olup (Wenzl et al., 2003) yapıştırıcı, boya, kağıt ve tekstil endüstrisi ve kozmetik ürünleri yapımında da kullanılmaktadır (Vattem and Shetty, 2003). Poliakrilamid malzemeler çok az miktarda akrilamid içermektedir ve bu monomerler suya veya gıdaya temas yoluyla geçebilmektedirler (Tritscher, 2004).

Akrilamid patates cipsleri, kızartılmış parmak patates ve ekmek gibi nişasta içeriği zengin gıdalarda 120° C üzerinde bir ısı işlem uygulandığında oluşmaya başlamaktadır (Pedreschi et al., 2006). Gıdaların pişirilmesi sırasında akrilamidin oluştuğu düşünülen yollardan olasılığı en yüksek olan Maillard reaksiyonunda asparagin amino asiti ve indirgen şekerler arasındaki reaksiyon sonucu oluşmasıdır (Taeymans et al., 2004, Claeys et al., 2005a; Knol et al., 2009). Tareke et al. (2002) proteince zengin gıdaların ısı işlem sonrasında düşük seviyelerde akrilamid (5-50 ppb) içerdiğini; fakat karbonhidrat içeriği zengin gıdalarda akrilamid seviyesinin çok daha yüksek (150-4000 ppb) değerlerde olduğunu belirtmişlerdir. Akrilamidin oluştuğu gıdalar; patates cipsi, kızarmış parmak patates, kızarmış ekmek, kahvaltılık tahıllar, unlu mamuller, bisküvi, kraker, kavrulmuş kuruyemişler, şerbetli tatlılar, patlamış mısır ve kahve olarak belirtilmektedir (Surdyk et.al., 2004; Zhang & Zhang, 2007; Eerola et al., 2007; Ölmez et al., 2008; Gökmen & Palazoğlu 2008; Chen et al., 2008).

2002 yılına kadar çevresel bir kontaminant olarak düşünülen akrilamidin aynı yıl İsveç Ulusal Gıda Örgütü (Swedish National Food Administration) ve

Stockholm Üniversitesi'nin birlikte yaptıkları çalışmada ısıl işlem uygulanmış nişasta içeriği yüksek gıdalarda kendiliğinden oluştuğu görülmüştür (Tareke et al., 2002; Ren et al., 2006; Göbel & Kliemant, 2007).

1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından, "Grup 2A" insanda kanserojenik etki yapma olasılığı bulunan bileşikler grubuna konulan akrilamidin, daha sonraki yıllarda yapılan hayvan denemelerinde kanserojen etkisinin olduğu saptanmıştır (IARC, 1994; Mucci et al. 2003; Dabrio et al., 2008). Yapılan hayvan denemeleriyle yüksek dozlardaki akrilamidin üreme ve sinir sistemini etkilediği, metabolik ürünü olan glisid amidin DNA'yı bağlayarak genetik hasara yol açtığı bulunmuştur (Dybing & Sanner, 2003). Akrilamidin insan vücudunda, mutajenik ve kanserojenik olduğu düşünülen glisidamide dönüştüğü belirtilmektedir (Claeys et al. 2005a).

Gıdalarda oluşan akrilamid miktarını etkileyen faktörler; gıdadaki indirgen şekerler, aminoasitler, yağlar, karbonhidratça zengin ve proteince zengin matriksler, pH, gıdanın nemi, agronomik ve genetik faktörlerdir (Claeys et al. 2005a; De Vleeschouwer et al., 2009; Friedman & Levin 2008).

Akrilamid analizi için en yaygın kullanılan yöntemler Gaz Kromatografisi (GC), Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (GC-MS), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)'dir (Leung et al., 2003; Wenzl et al, 2003; Gökmen & Palazoğlu 2008). Akrilamid analizlerinde iç standart tekniği yaygın olarak kullanılır. Bu amaçla kullanılan en yaygın iç standartlar izotop etiketli [$^{13}\text{C}_3$] akrilamid, [D_3]-akrilamid, [$^{13}\text{C}_1$] akrilamiddir (Wenzl et al., 2003; Kim et al., 2007; Zou et al., 2008).

Bu çalışmada LC-MS/MS cihazında akrilamidi analiz etmek üzere yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem validasyon parametreleri olan saptama limiti (limit of detection), raporlama limiti (limit of quantification), geri kazanım (%) değeri kumru örnekleri ile çalışılarak belirlenmiştir. Piyasadan temin edilen ve İzmir'e özgü geleneksel ürünlerimizden olan 20 adet kumru ve 20 adet boyoz örneğinde akrilamid analizleri ilk kez gerçekleştirilmiştir. Akrilamid analizlerinde iç standart tekniği kullanılmıştır. İç standart olarak D_3 (döteryum etiketli, izotop) akrilamid kullanılmıştır. Ayrıca bu örneklerin tamamında pH, nem, renk değerleri L^* , a^* , b^* , indirgen şeker, protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin akrilamid konsantrasyonu ile pH, nem, renk değerleri L^* , a^* , b^* , indirgen şeker,

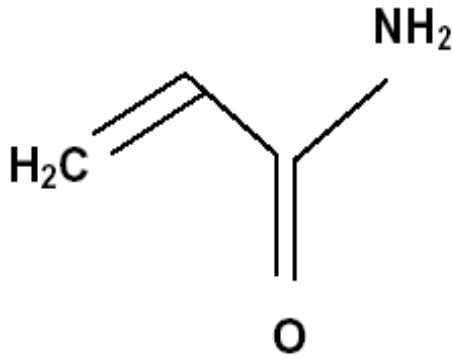
protein konsantrasyonları arasında korelasyon araştırılmıştır. Tüm sonuçlar SPSS 13.0 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gıdaların islenmeleri veya dayanıklı hale getirilmeleri sırasında 90 - 200°C arasında değişen ısı işlemlere (pişirme, fırınlama, kızartma, kavurma, sterilizasyon) sıklıkla başvurulmaktadır. Ancak uygulanan böylesi yüksek sıcaklıklar gıdada toksik bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Gıdalara uygulanan ısı işlemler sonucunda oluşan kanserojenik / mutajenik bileşiklerin en önemlileri ve en iyi bilinenleri; heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-alkil-N-nitrosamin bileşikleri ve 2002'de İsveç Ulusal Gıda Örgütünün yaptığı çalışmayla toksik olduğu ortaya çıkan akrilamid (Claeys et al., 2005a).

2.1. Akrilamid

Akrilamid (2-propenamid-CH₂CHCONH₂) erime noktası 84,5°C ve kaynama noktası 192,6°C, molekül ağırlığı 71,08 g/mol olan beyaz renkli kristal yapı katı bir madde olup su, etanol ve aseton gibi polar çözücülerde iyi çözünürken, hegzan heptan gibi polar olmayan çözücülerde az miktarda çözünebilmektedir. Sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir (2155 g/l) (Friedman, 2003; Rice, 2005; Zhang & Zhang, 2007; Zhou et al., 2007). Akrilamidin hafif asidik bir yapısı vardır (Girma et al., 2005).



Şekil 2.1. Akrilamidin Yapısı (Ötleş & Ötleş; 2004a)

Akrilamid yapıştırıcı, boya, kağıt, tekstil endüstrisi ve kozmetik ürünleri yapımında kullanılan poliakrilamidin monomeridir (Lingnert et al. 2002, Vattem & Shetty, 2003; Ötleş & Ötleş; 2004a; Girma et al., 2005; Galesa et al., 2008). Poliakrilamid malzemeler çok az miktarda akrilamid içermekte ve bu monomerler suya ve gıdaya temas yoluyla bulaşabilmektedir (Tritscher, 2004).

2.2. Gıdalarda Akrilamid Oluşumu

Isıl işlem uygulanmamış gıdalarda saptanabilir miktarlarda akrilamid ($< 5 \mu\text{g} / \text{kg}$) bulunmamaktadır. Bu durum akrilamidin oluşumu için ısıl işlemin gerekli olduğunu göstermektedir (Amrein et. al., 2005). Akrilamidin oluşumu için 100°C 'nin üzerinde sıcaklık gereklidir (Bacalski et. al., 2003). Akrilamid patates cipsleri, kızartılmış parmak patates, ekmek gibi nişasta içeriği zengin gıdalarda 120°C üzerinde bir ısıl işlem uygulandığında oluşur (Pedreschi et al., 2006). Çiğ ya da ısıl işlem uygulanmamış gıdalarda ise akrilamid oluşumunun gerçekleşmemesi karbonhidratça zengin gıdaların pişirilmeleri sırasında bazı reaksiyonların akrilamid oluşumundan sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (Granda, 2005).

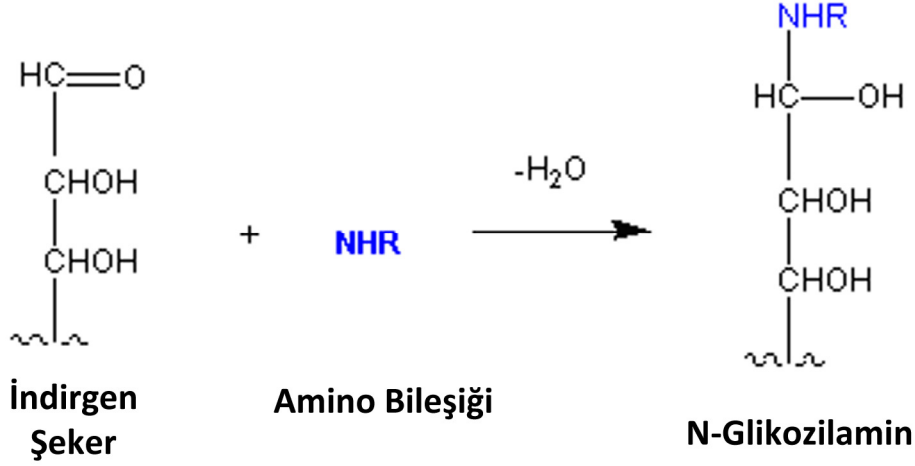
Gıdaların pişirilmesi sırasında akrilamidin oluşumunun birkaç yoldan gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

2.2.1. Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşumu

Gıdaların pişirilmesi sırasında akrilamidin oluşumunda olasılığı en yüksek olan yol, Maillard reaksiyonunda asparagin amino asiti ve indirgen şekerler arasındaki reaksiyon sonucu oluşmasıdır (Taeymans et al., 2004, Claeys et al. 2005a; Knol et al., 2009). Tareke et al. (2002) proteince zengin gıdaların ısıl işlem sonrasında makul seviyelerde akrilamid ($5-50 \text{ ppb}$) içerdiğini; fakat karbonhidrat içeriği zengin gıdalar da akrilamid seviyesinin çok daha yüksek ($150-4000 \text{ ppb}$) değerlerde olduğunu belirtmişlerdir.

Maillard reaksiyonları gıdaların lezzet ve görüntüsünün gelişiminde önemli rol oynayan enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarıdır. Akrilamid gıdalarda Maillard reaksiyonunun bir yan reaksiyon ürünü olarak oluşur (Wilde et al., 2005). Akrilamid oluşumuna neden olan Maillard reaksiyondaki temel katılımcılar asparajin aminoasidi, fruktoz ve glukoz indirgen şekerleridir (Claeys et al., 2005a). Maillard reaksiyonunda ilk basamak (ana reaksiyon), asparajin ve

indirgen şekerlerden Schiff bazının oluşmasıdır. Anahtar basamak ise Maillard reaksiyonlarına öncülük eden Schiff bazının dekarboksilasyonudur (Claeys et al., 2005b). Glukoz gibi bir indirgen şeker, bir protein ya da aminoasidin serbest amino grubu ile reaksiyona girerek, bir kondensasyon ürünü olan N-glukozilamin oluşturmaktadır. Bu reaksiyonun oluşum mekanizması Şekil 2.2.'de gösterilmiştir (Ötleş & Ötleş, 2004b; Zhang & Zhang, 2007; Santis et al., 2007; Ahrne et al., 2007; Quayson & Ayernor, 2007; Morales & Arribas-Lorenzo, 2008).



Şekil 2.2. Maillard reaksiyonlarının oluşum mekanizması (Ötleş & Ötleş, 2004b)

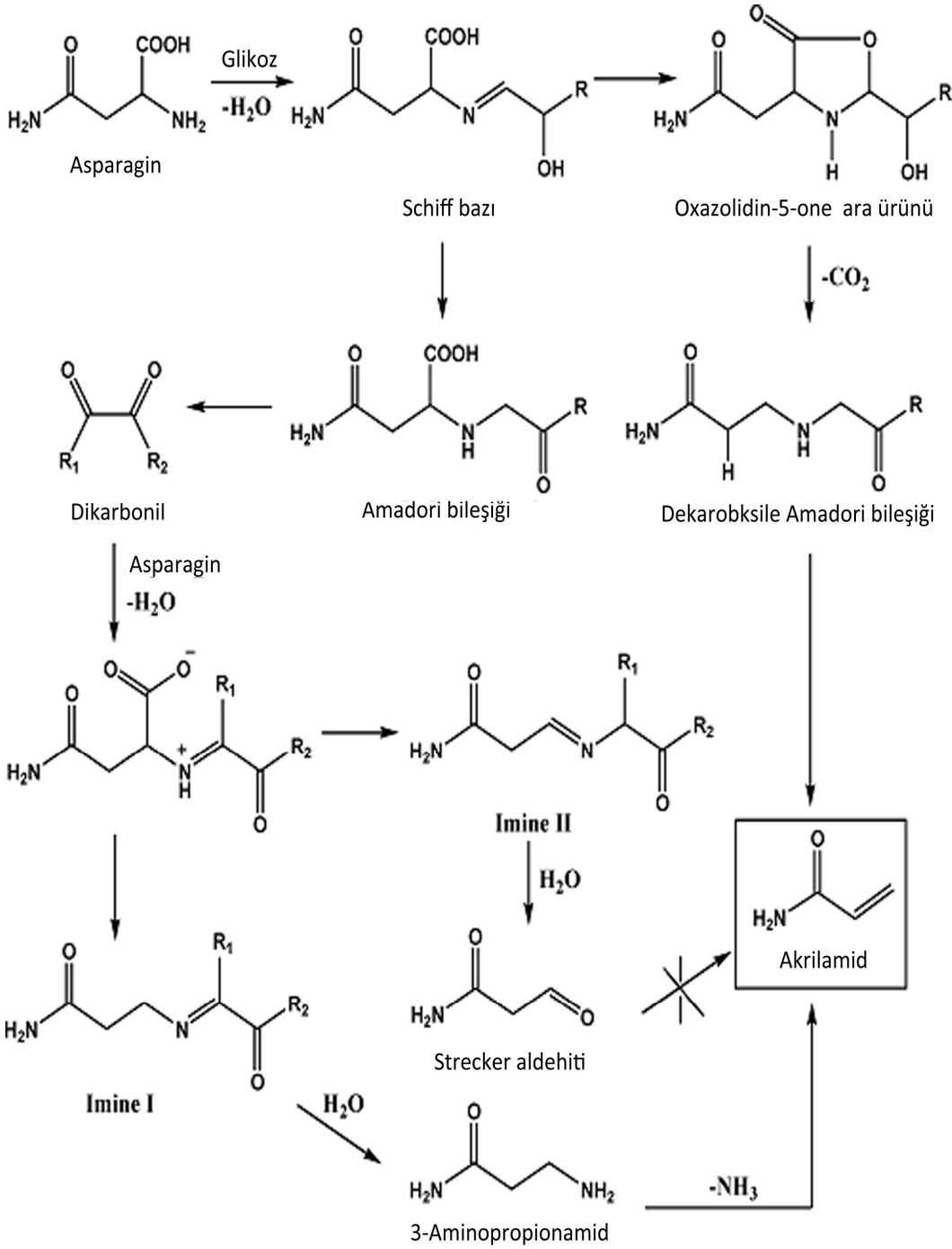
N-glukozilaminin tekrar düzenlenmesi sonucu Amadori bileşiği oluşmaktadır. Amadorinin bir sonraki parçalanma ürünü pH'ya bağlı olarak değişmektedir. pH 7 ya da altında, 1,2-enolizasyon reaksiyonu ile pentozlardan furfural, hegzozlardan hidroksimetilfurfural oluşmaktadır. pH 7'den büyük olduğunda, Amadori bileşiğinden 2,3-enolizasyon reaksiyonu ile 4-hidroksi-5-metil-2,3-dihidrofuran-3-one (HMF_{one}), asetol, diasetil oluşmaktadır. Bu bileşiklerin hepsi reaktif olup, daha ileri reaksiyonlarda da görev almaktadır. Dikarbonil bileşikleri aminoasitlerle reaksiyona girerek aldehit ve α -aminoketon oluşturmaktadır. Bu reaksiyonlar, Stecker degradasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir. Enolizasyon reaksiyonları, Amadori düzenlenmeleri, izomerizasyon ve ileri kondensasyon reaksiyonları sonucunda melanoidin olarak bilinen kahverengi azotlu polimer ve ko-polimerler oluşmaktadır (Zhang & Zhang, 2007).

Sonuç olarak; maillard reaksiyonunda, akrilamid oluşum mekanizmasında bir karbonil kaynağı ile asparaginin amino grubu arasında Schiff bazı olduğu ve sonrasında Schiff bazının ısı etkisi ile dekarboksile olarak akrilamide dönüştüğü düşünülmektedir (Zyzak et al. 2003; Yaylayan et al., 2003; Blank, 2005; Dabrio et

al., 2008; Mottram & Friedman, 2008; Geng et al., 2008; Pedreschi et al., 2008; Yuan et al., 2008; Hasewaga et al., 2007; Arribas-Lorenzo & Morales, 2009). Su kaybetmiş N-glukozil bileşiği ile bağlantılı olan Schiff bazının bu reaksiyonları açıklamada katkıları olmuştur. Ancak sadece anahtar bazı bileşenler tanımlanabilmiştir ve bu sebeple akrilamid oluşumunu oluşturan kimyasal interaksyonların büyük kısmı hipotez olarak durmaktadır (Zhang & Zhang, 2007).

Asparaginin dekarboksilasyonu ve deaminasyonu tek başına gerçekleşebilmesine rağmen, akrilamidin oluşabilmesi için ortamda şekerlerin varlığı gerekmektedir (De Vleeschouwer et al., 2009).

Akrilamidin dekarboksile amodori bileşiği üzerinden oluşması Şekil 2.3.'de gösterilmiştir. Şekil 2.3.'de de görüleceği gibi, asparagin ve karbonil grubu (indirgen şeker) arasındaki amino-karbonil reaksiyonundaki kritik aşama, yüksek sıcaklıkta dehidrasyon sonrasında N-glukozil ve Schiff bazı oluşumdur. Düşük nemli koşullarda hem N-glukozil, hem de Schiff bazı bileşikleri stabildir. Sulu sistemlerde Schiff bazı öncü maddelere hidroliz olmakta ya da Amodori bileşiğini oluşturmaktadır. Amodori bileşiği akrilamid oluşumunda etkili bir öncü madde değildir. Schiff bazı oxazolidine-5-one üzerinden dekarboksile olarak dekarboksile amodori bileşiğini oluşturmaktadır (Zhang & Zhang, 2007; Claus et al., 2008). Dekarboksile Olmuş Amadori Bileşiğinden ya da Asparaginin dikarbonillerinden Akrilamid oluşum mekanizması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

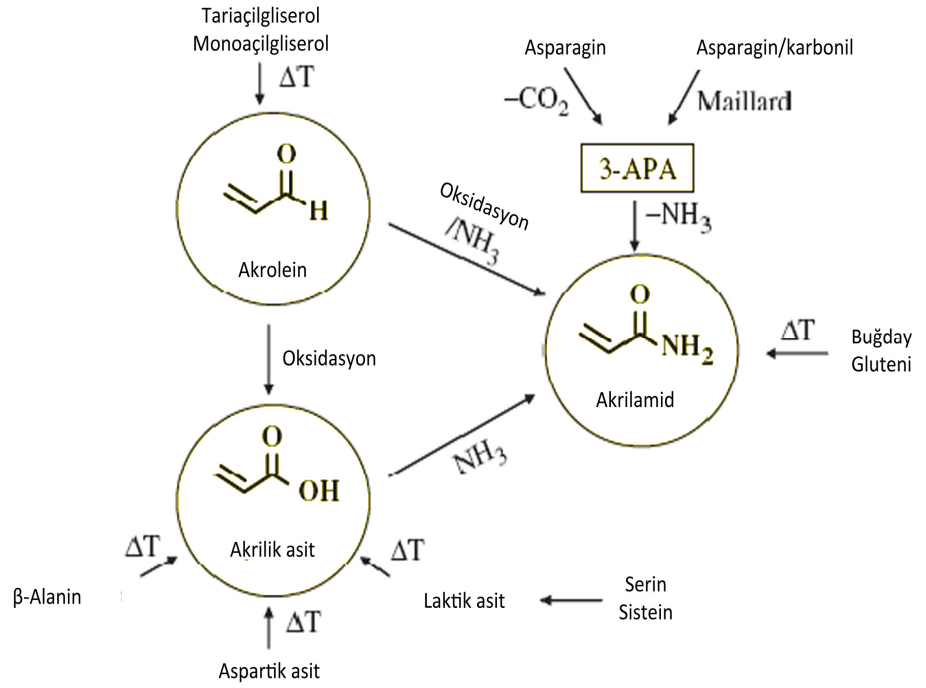


Şekil 2.3. Dekarobksile Olmuş Amadori Bileşiğinden ya da Asparagin Dikarbonillerinden Akrlamid Oluşum Mekanizması (Zhang & Zhang, 2007).

2.2.2. Akrolein Bileşiği Üzerinden Akrlamid Oluşumu

Akrlamidin öncü maddelerinden biri olan akrolein ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$), lipidlerin transformasyonu ya da aminoasitlerin, proteinlerin ve karbonhidratların degradasyonu sonucu da oluşabilmektedir (Friedman, 2003; Claeys et al. 2005a; Gerrad 2006; Shaikh et al., 2009). Akrolein okside olarak, akrilik aside

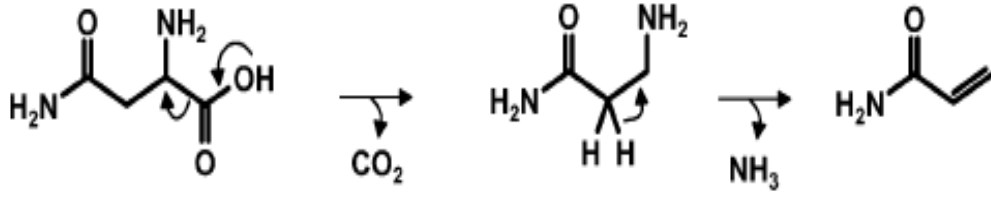
yükseltgenmekte ve amonyak ile reaksiyona girerek akrilamidi oluşturmaktadır (Tayesman et al., 2004; Claus et al., 2008; Shaikh et al., 2009). Aminoasitlerin termolizisi sırasında açığa çıkan amonyağın akrilik asit ile reaksiyona girerek, amino-dehidroksilasyon ile akrilamidi oluşturduğu ifade edilmektedir (Guenther et al., 2007). Şekil 2.4.'de akrolein üzerinden akrilamid oluşum mekanizması görülmektedir.



Şekil 2.4. Akrolein üzerinden akrilamid oluşum mekanizması (Guenther et al., 2007)

2.2.3. “3-APA” Bileşiği Üzerinden Akrilamid Oluşumu

İndirgen şekerlerin yokluğunda, dekarboksile olmuş asparagin yani 3-aminopropiyonamid (3-APA), akrilamidi oluşturabilmektedir (Zhang et al., 2005; Amrein et al., 2007; Guenther et al., 2007; Locas & Yaylayan, 2008). 3-aminopropiyonamid ısıtma ile deaminasyona uğrayarak, akrilamid oluşumuna neden olmaktadır. 3-APA varlığında ısıtma ile akrilamid kolaylıkla oluşabilmektedir, bu reaksiyonun Maillard üzerinden yürümediği ve indirgen şekerlere gereksinim duyulmadığı belirtilmektedir (Bagdonaite et al., 2006). Asparagin deaminasyonu/dekarboksilasyonundan direk olarak akrilamid oluşumu Şekil 2.5.' de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Akrlamidin asparaginin deaminasyonu/dekarboksilasyonu ile oluşumu (Granvogl & Schieberle, 2006)

Channell et al. (2008) tarafından nişasta bazlı gıdalarda yapılan çalışmada akrilamid ile 3-aminopropiyonamid arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir. Locas & Yaylayan (2008) tarafından yapılan çalışmada, N-glukozil-3-aminopropiyonamidin akrilamid oluşumunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

2.2.4. Okside Olmuş Lipidler Üzerinden Akrlamid Oluşumu

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, okside olmuş lipidlerin aminoasitleri Strecker aldehitlerine degrade edebildiği ve böylelikle akrilamid oluşumunun başladığı belirtilmektedir. Okside olmuş lipidlerden 2,4-dekadienal'in, diğer okside lipidlere göre asparagini akrilamide dönüştürmede daha etkili olduğu bulunmuştur.(Hidalgo et al., 2009).

2.3. Akrlamidin Oluştugu Gıdalar

100-120°C'nin üzerinde gerçekleştirilen ısıtma işleminden sonra en yüksek akrilamid miktarı karbonhidratça zengin gıdalarda (100-4000 µg/kg) ve en düşük akrilamid miktarı proteince zengin gıdalarda (< 100 µg/kg) bulunmuştur (Tareke et al., 2002). Akrlamidin oluştuğu gıdalar; patates cipsi, kızarmış parmak patates, kızarmış ekmek, kahvaltılık tahıllar, unlu mamuller, bisküvi, kraker, kavrulmuş kuruyemişler, şerbetli tatlılar, patlamış mısır ve kahve olarak belirtilmektedir (Surdyk, 2004; Zhang & Zhang, 2007; Eerola et al., 2007; Ölmez et al., 2008; Gökmen & Palazoğlu 2008; Chen et al., 2008). Farklı gıdalarda yapılan çalışmalarda elde edilen akrilamid düzeyleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı Gıdaların Ortalama Akrilamid Düzeyleri

Gıdamın Adı	Ort. (µg/kg)	Medyan (µg/kg)	Aralık	Örnek sayısı	Kaynak
Patates Kızartması (evde yapılan)	63	63	60-66	2	Ölmez et al., 2008
Patates Kızartması (Fast food restoranında)	403	414	355-436	9	Ölmez et al., 2008
Türk kahvesi	266	264	200-336	4	Ölmez et al., 2008
Kahve (Orta derecede kavrulmuş)	25	25	25	2	Svensson et al., 2003
Kavrulmuş Kahve	---	174	202 (Mak.)	3	Arisseto et al., 2009
Kavrulmuş Kahve	221	286	79-975	---	Gökmen & Palazoğlu, 2008
Bisküvi	198	82	<10-648	16	Ölmez et al., 2008
Diyebatik bisküvi	270	186	10-1695	125	Göbel & Kliemant, 2007
Büsküvi/Kurabiye	300	230	<30-640	11	Svensson et al., 2003
Tatlı Bisküvi	443	310	<68- 1150	15	Eerola et al., 2007
Tuzlu Bisküvi	179		134-224	2	Eerola et al., 2007
Çocuk Bisküvisi	106	108	5-432	130	Göbel & Kliemant, 2007
Bademli Bisküvi	356	230	5-2110	81	Göbel & Kliemant, 2007
Kraker	247	213	26-587	18	Ölmez et al., 2008
Bebek Bisküvisi	152	98	32-613	24	Ölmez et al., 2008
Ekmek	38	43	<10-85	22	Ölmez et al., 2008
Ekmek	50	40	<30-160	21	Svensson et al., 2003
Ekmek	38	24	10-133	10	Chen et al., 2008
Tost Ekmeği	164	58	41-474	5	Ölmez et al., 2008
Peksimet	95	73	<10-226	5	Ölmez et al., 2008
Peksimet	300	135	<30- 1900	21	Svensson et al., 2003
Peksimet	---	71	231 (Mak.)	7	Arisseto et al., 2009
Patates cipsi	834	818	59-2336	8	Ölmez et al., 2008
Patates cipsi	1360	980	330- 2300	11	Svensson et al., 2003
Patates cipsi	831	528	5-4215	---	Gökmen & Palazoğlu 2008
Patates cipsi	1377	186	5-4653	---	Gökmen & Palazoğlu 2008
Patates cipsi	539	440	100-	15	Eerola et al., 2007

			1470		
Patates kızartması	540	410	300-1100	7	Svensson et al., 2003
Patates kızartması	---	264	2528 (Mak.)	7	Arisseto et al., 2009
Patates cipsi	---	591	1999 (Mak.)	12	Arisseto et al., 2009
Patates Kızartması	310	300	34-688	8	Svensson et al., 2003
Haşlanmış Patates	<30	---	---	---	Svensson et al., 2003
Kahvaltılık Tahıllar	220	100	<30-1400	14	Svensson et al., 2003
Kahvaltılık tahıllar	84	50	5-545	47	Göbel & Kliemant, 2007
Patlamış mısır	500	390	365-715	3	Svensson et al., 2003
Patlamış mısır	300	290	260-350	3	Eerola et al., 2007
Mısır cipsi	425	371	109-835	9	Ölmez et al., 2008
Corn flakes	---	30	49 (Mak.)	8	Arisseto et al., 2009
Fırıncılık Ürünleri	120	19	<10-441	4	Ölmez et al., 2008
Kek	68	65	43-89	9	Chen et al., 2008
Kavrulmuş Fındık	128	42	<10-421	5	Ölmez et al., 2008
Kavrulmuş Badem	260	260	207-313	2	Ölmez et al., 2008
Çikolata	75	78	37-100	5	Ölmez et al., 2008
Helva	93	86	<10-229	7	Ölmez et al., 2008
Zeytin(siyah,salamura)	82	70	<10-216	8	Ölmez et al., 2008
Tulumba tatlısı	241	50	10-701	5	Ölmez et al., 2008
Kemalpaşa Tatlısı	512	512	445-578	2	Ölmez et al., 2008
Çilek reçeli	<10	<10	---	1	Ölmez et al., 2008
Pekmez	95	42	<10-297	4	Ölmez et al., 2008
Kurutulmuş kırmızı biber	<10	<10	---	1	Ölmez et al., 2008
Kakao	<10	<10	---	3	Ölmez et al., 2008
Makarna	<30	---	---	---	Svensson et al., 2003
Havuç suyu	70	70	1-140	2	Chen et al., 2008
Pizza	Nd	---	---	10	Eerola et al., 2007

2.4. Akrilamidin Sağlık Üzerine Etkisi

2002 yılına kadar çevresel bir kontaminant olarak değerlendirilen akrilamidin aynı yıl İsveç Ulusal Gıda Örgütü (Swedish National Food Administration) ve Stockholm Üniversitesinin birlikte yaptıkları çalışmada ısıtıl

işlem görmüş nişasta bazlı gıdalarda kendiliğinden oluştuğu görülmüştür (Tareke et al., 2002; Ren et al., 2006; Göbel & Kliemant, 2007).

1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından, “Grup 2A” yani insanda kanserojenik etki yapma olasılığı bulunan bileşikler grubuna konulan akrilamidin, daha sonraki yıllarda yapılan hayvan denemelerinde kanserojen etkisinin olduğu saptanmıştır (IARC, 1994; Mucci et al., 2003; Dabrio et al., 2008). Yine yapılan hayvan denemeleriyle yüksek dozlardaki akrilamidin üreme ve sinir sistemini etkilediği, metabolik ürünü olan glisid amidin DNA’yı bağlayarak genetik hasara yol açtığı bulunmuştur (Dybing & Sanner, 2003). Akrilamidin insan vücudunda, mutajenik ve kanserojenik olduğu düşünülen glisidamide dönüştüğü belirtilmektedir (Claeys et al. 2005a). Akrilamid sudaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle vücutta (süt ve plasenta dahil) çok geniş bir alana dağılmaktadır (Tritscher, 2004; Granby & Fagt, 2004; Friedman & Levin, 2008). Ağız yolu ile alınan yüksek dozda akrilamidin 13 laboratuvar hayvanında kansere yol açtığı sonuç olarak da insanlar için potansiyel kanserojen olduğu düşünülmektedir. 2005 yılında WHO ve FAO birlikte, işlenmiş ya da yüksek sıcaklıkta pişirilmiş özellikle bazı gıdaların önemli düzeylerde akrilamid içerdiklerini ve bu gıdaların insan sağlığı için önemli riskler taşıyabileceğini bildirmişlerdir (Zhang et al., 2006). Kağıt fabrikalarında ve suda çözünen polimerlerin üretildiği işletmelerde çalışan işçilerin solunum ve temas ile akrilamide maruz kaldığı belirtilmektedir (Galesa et al., 2008). Akrilamidin nörotoksik, karsinojenik ve üreme sistemi üzerinde etkileri bulunduğu saptanmıştır (Quayson & Ayernor, 2007; Mottram & Friedman, 2008; Yuan et al., 2008; Chen et al., 2008; Knol et al., 2009). İçme suyu ya da farklı şekillerde akrilamide maruz bırakılan fareler üzerinde yapılan denemelerde akrilamidin pek çok organda kansere sebep olduğu belirtilmektedir (Rice, 2005).

Çin’de akrilamid üreten küçük fabrikalarda çalışan işçilerin işleri gereği kısa süreliğine akrilamide maruz kalmaları zayıf bacaklar, ayak parmaklarının refleksini ve duyarlılıklarını kaybetmesi, uyuşmuş eller gibi belirtilere neden olduğu belirtilmektedir (He et al., 1989). Akrilamide maruz kalan işçilerin, periferik nöropati (his bozukluğu) belirtileri sergilemesi bu bileşiğin insan üzerinde nörotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir (Calleman et al., 1993; Costa, 1996; Gerrard, 2006). Akrilamide daha uzun süreli maruz kalma durumunda nöropatiyi takiben serebellar disfonksiyon (beyincik ile ilgili dengesiz bozukluk) içeren daha ciddi belirtiler gözlenmiştir (He et al., 1989). Sıçanlarla yapılan içme suyu çalışmasında periferik nöropati (his bozukluğu) oluşumu için

NOAEL değeri günlük 0,5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiş olup daha yüksek düzeylerde merkezi sinir sistemi nöropatisi de gözlenmiştir (Tritscher, 2004).

Farelerin ve sıçanların spermatidlerinde akrilamidin mutasyonlara neden olduğu rapor edilmiştir. Bundan dolayı memeli üreme hücresi mutajeni olduğu düşünülmektedir (Shelby et al., 1987; Adler et al., 2002). Sıçanların 30-90 gün süreyle günlük 5-20 mg/kg seviyelerde akrilamid ile beslendiğinde sıçanlarda nörolojik belirtiler ortaya çıkmakta ve bununla beraber, sıçanlarda döllenme yeteneği hızı, hamile dişilerde yavru büyüklüğü düşmekte ve erkeklerde sperm sayısı azalmaktadır (Chapin et al., 1995; Sakamoto & Hashimoto, 1986; Wise et al., 1995). Sıçanlarla yapılan diğer bir çalışmada üreme toksisitesinin NOAEL değeri günlük 0,5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Tritscher, 2004).

İnsanların beslenme sırasında aldığı akrilamid miktarının, deney hayvanlarının maruz kaldığı dozdan birkaç kat daha az olduğu ve insanların gıda yolu ile aldığı akrilamidin etkili bir şekilde vücuttan uzaklaştırılabileceği belirtilmektedir (Mucci et al., 2003; Claus et al., 2008b). Akrilamid vücuda alındıktan sonra, hızla kana karışmaktadır. Akrilamid suda kolay çözünmekte ve bağırsakta hızlı bir şekilde emilmektedir. Üre yolu ile atılımı hızlı olup, akrilamidin yarısı birkaç saat içerisinde vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Claus et al., 2008). Ancak insanlar için yaşam boyu tüketilen günlük akrilamid miktarının 1 µg akrilamid/kg vücut ağırlığı düzeyinde olması durumunda kanser riski 1000'de 0,7-4,5 arasında olmaktadır (Mucci, et al., 2003).

Pelucci et al (2003) İtalya ve İsviçre'de (79 yaş altı insanlarla 1991-2000 yıllarında hastanede yatan) vaka-kontrol çalışması yapmışlar; kızarmış patates ve patates cipsi tüketimi ile çeşitli kanser olguları (ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, gırtlak, kalın bağırsak, kolon, rektum, yumurtalık) arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışma sonucunda fırınlanmış patates tüketimi ile kanser riski arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. Bu genel sonucun aksine kızartılmış patates tüketimi ile kalın bağırsak kanseri arasında açık bir ilişkinin ortaya çıktığı görülmüştür.

2.5. Gıdalarda Akrilamid Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.5.1. İndirgen Şeker Miktarı

Nişasta ve sakkaroz, laktoz, maltoz gibi şekerler 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hafif asidik pH'da parçalanmaktadır. Bu nedenle, ısıtma işlemi sırasında çoğu zaman kompleks karbonhidratlardan monosakkaritler oluşmaktadır. Gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan bu şekerler, asparagin ile tepkimeye girerek akrilamidi oluşturmaktadır. Şekerlerin zincir uzunluğu kısalırsa, oluşan akrilamid miktarı artmaktadır. Şekerlerin zincir uzunluğunun kısalması ile molekülün halkalı yarı asetal yapı kazanması zorlaşmaktadır. Bu nedenle, karbonil kolaylıkla, asparaginin α -amininin saldırılarına maruz kalmaktadır. Akrilamid oluşumunun gıdadaki glukoz ve früktoz düzeyi ile orantılı olduğu rapor edilmiştir. Glukoz ve früktoz kıyaslandığında, asparajin-şeker model sisteminde, kuru patatese veya buğday ununa eklendiğinde früktoz glukozu göre daha yüksek akrilamid oluşumuna sebep olmuştur (Claeys et al. 2005a).

2.5.2. Amino Asitler

Patatesteki asparagin toplam aminoasit miktarının %40'ını, unda %14'ünü, yüksek proteinli çavdarda %18'ini oluşturmaktadır. Asparagin/glukoz oranının 0,5 olması akrilamid oluşumu için en uygun ortamı oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda düşük asparagin ve fruktoz içeren un, fruktoz ilavesinin akrilamid oluşumunu etkilemediği, ama asparagin ilavesinin akrilamid oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Claeys et al. 2005a). Undaki asparagin, akrilamid oluşumunda patatesteki indirgen şeker gibi belirleyici faktördür (Claeys et al. 2005a; Wicklund et al., 2006). Asparagin dışındaki aminoasitlerden akrilamid oluşumu henüz tam olarak belirlenmemiştir. Glutamin, metiyonin, sistein, aspartik asit ya da serin, alanin, prolin ve fenilalenin ile glukozdan oluşan sistemde çok az akrilamid oluştuğu tespit edilmiştir (Claeys et al., 2005a).

2.5.3. Yağlar

Akrilamidin oluştuğu düşünülen yollardan biri, gliserolden oluşan akrolein üzerinden oluşması veya çoklu doymamış yağ asitlerinin ve bunların bozulma ürünlerinin oksidasyonu sonucu oluşmasıdır. Yağlar dumanlanma noktasının üzerindeki sıcaklıklara ısıtıldığında, gliserol akroleine parçalanmaktadır. Yağdaki doymamışlık düzeyinin artması ile akrolein oluşumu artmakta ve dumanlanma

noktasını düşürmektedir. Ancak, akrilamid temel olarak, yağın kendisinde bulunan akrolein gibi öncü maddelerden oluşmamaktadır. Çünkü, akrilamid oluşumu oksidatif bir olay değildir. Okside olmuş yağların asparagin/karbonil üzerinden akrilamid oluşumunda diğer karbonil bileşiklerine göre daha önemsiz rolleri bulunmaktadır. Diğer taraftan, yağın cinsi akrilamid oluşum hızını etkileyebilmektedir (Taeysman et al., 2004; Claeys et al. 2005a).

2.5.4. Karbonhidratça zengin ve proteince zengin matriksler

Kızartılmış ya da ızgara et ve balık ürünleri, patates ve tahıl ürünlerine göre düşük miktarda akrilamid içermektedir. Asparagin ve glukoz karışımları patates nişastası matrikslerine ilave edildiğinde, tam buğday unu ya da et matrikslerine göre daha fazla akrilamid oluşumuna neden olmaktadır. Gıda matriksinin akrilamid oluşumunu arttırma, azaltma gibi etkilerinin olduğu ispatlanmıştır. Ancak, hangi faktörlerin nasıl etkiledikleri henüz tamamen belirlenememiştir. Matriksin etkisinin öncü madde olmadığı zaman, ortaya çıktığı söylenemez. Çünkü, mısır ve buğday unu patatesteki konsantrasyona kadar asparagin ile zenginleştirildiğinde, patatestekinin ancak beşte biri kadar akrilamid oluşumu saptanmıştır. Aynı zamanda akrilamidin mısır ve buğday ununda patatese göre daha yavaş parçalandığı görülmüştür. Proteince zengin bir gıda ve nişasta bakımından zengin bir gıda karşılaştırıldığında, akrilamid degradasyonun, proteince zengin gıdada daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bu da akrilamidin proteinlerdeki aminoasitlerle reaksiyona girmesinden kaynaklanmaktadır.

Glukoz-asparagin model sistemine ya da homojenize edilmiş patatese lizin ilave edilmesi akrilamid oluşumunu azaltmaktadır. Bu azalmanın nedeni, Maillard reaksiyonunda lizin serbest amino grubundaki reaktivitesinin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Glukoz-asparagin model sistemine sistein ilavesi, akrilamid oluşumunu azaltmaktadır. Buradaki azalma da sisteinin akrilamid oluşum reaksiyonlarını etkilemesi ve/veya akrilamidin sistein ile reaksiyona girmesi ile açıklanmaktadır.

Gıda matriksindeki partiküllerin boyutları da akrilamid oluşumunu etkileyebilmektedir. Patatesteki yapılan çalışmada patatesi toz haline getirme akrilamid oluşumunu etkilemezken, unda yapılan çalışmada partikül boyutunun akrilamid oluşumunu etkilediği görülmüştür. Çünkü, undaki partiküllerin boyutu tahılın nişasta ve protein miktarını etkilemektedir. Nişasta granülleri ne kadar zarar görürse enzimatik hidrolize o kadar açık olurlar. Öğütme süresinin uzaması

hem asparagin, hem de indirgen şeker miktarını etkilemektedir. Yani, daha az öğütülen unlarda akrilamid miktarı düşmektedir (Claeys et al., 2005a).

2.5.5. Gıdanın pH'sı

pH hem şeker grubunun, hem de amino grubunun reaktivitesini etkilemektedir. Yüksek pH'da, şeker açık zincir formunu ve amino grubu da protonlanmamış durumunu tercih eder. Bu gruplar da reaktif formlardır (Claeys et al., 2005a). Akrilamid oluşumu için optimum pH 7-8 dir. Asparagin ve glukoz içeren bir model sistemin pH'sının 7'den 4'e düşürülmesi ile akrilamid oluşumunun %99 azaltılabildiği belirtilmiştir (Jung et al., 2003). pH'nın düşürülmesi ile asparaginin protonlanmamış serbest α -amino grubu protonlanmış amin grubuna ($-\text{NH}_3^+$) dönüşmektedir. Böylelikle, schiff bazının oluşumu bloke olmaktadır. Schiff bazının oluşumu akrilamid oluşumunda en temel basamaktır. Bu nedenle akrilamid oluşumu pH'nın düşmesi ile azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada, mısır cipslerinin kızartma işlemi öncesinde %0,1-0,2 ya da %1-2'lik sitrik asitli çözeltiliye daldırılmasının, akrilamid oluşumunu azalttığı görülmüştür (Claeys et al. 2005a, Foot et al., 2007; Mestagh et al., 2008).

2.5.6. Gıdanın Nemi ve Su Aktivitesi

Gıdanın nemi %10-20 arasında olduğu zaman, akrilamid oluşumu ve eliminasyonu aynı anda gerçekleşmektedir. Maillard reaksiyonları ise, %12-18 nem düzeyinde etkin olarak gerçekleşmektedir. Nem içeriği azaldıkça oluşacak akrilamid miktarının arttığı belirtilmektedir (Claeys et al. 2005a; Wicklund et al., 2006).

2.5.7. Agronomik ve Genetik Faktörler

İşlenmemiş ürünün genetik yapısı, ürünün işlenmesi sırasında oluşacak akrilamid miktarını etkilemektedir. Örneğin ekmeğin akrilamid içeriği kullanılan buğdaya bağlıdır. Gübrelemenin çok yapıldığı toprakta yetişen buğdayın azot dolayısıyla protein miktarı da yüksektir. Bu ürünün işlenerek pişirilmesi sonrasında daha yüksek akrilamid oluşmaktadır (Friedman & Levin 2008).

2.5.8. Proses Parametreleri

Yapılan çalışmalarda, proses sıcaklığının artması ve/veya süresinin uzaması ile akrilamid oluşumunun arttığı belirlenmiştir. Ancak, akrilamid düzeyi maksimum değere ulaştıktan sonra, aşırı pişirme sonrasında akrilamidin degrades olması sebebiyle azaldığı saptanmıştır (Claeys et al. 2005a; Pedreschi et al., 2006).

2.6. Gıdalarda Akrilamid Analiz Yöntemleri

Akrilamid gıda analizcileri için oldukça yeni bir konu olmasına rağmen, 2002'de gıdalarda olduğu tespit edildiğinden bu yana akrilamid ile ilgili çok sayıda yöntem geliştirme çalışması yapılmış ve halen bu çalışmalar devam etmektedir. Akrilamid analizi için kullanılmakta olan yöntemler Gaz Kromatografisi (GC), Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (GC-MS), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)'dir. Bunlardan en yaygın kullanılan yöntemler GC-MS ve LC-MS/MS'dir (Leung et al., 2003; Wenzl et al, 2003; Gökmen & Palazoğlu 2008).

Akrilamid analizinde örnek hazırlama aşaması önemlidir. Gıda matriksine bağlı olarak örnek kurutulur ve öğütülür (Hoenicke et al., 2004). Akrilamidin örnekten ekstraksiyonu sırasında kayıplar olabilmektedir. Bu kayıpları önlemek için, ekstraksiyon işleminin başlangıcında akrilamid izotopu iç standart olarak ilave edilmektedir. Ancak iç standart sadece MS bazlı cihazlarda yapılan çalışmalarda kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan en yaygın iç standartlar izotop etiketli [$^{13}\text{C}_3$] akrilamid, [D_3]-akrilamid, [$^{13}\text{C}_1$] akrilamiddir (Wenzl et al, 2003; Kim et al., 2007; Zou et al., 2008).

Yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler arasındaki en büyük farklar; akrilamidin ekstraksiyon (ekstraksiyon çözgenin içeriğindeki değişkenler, ekstraksiyon sıcaklığının ve süresinin tanımlanması, mekanik uygulamalar) ve temizleme aşamaları olarak tespit edilmiştir. Akrilamid suda organik solventlere göre daha fazla çözündüğü için, genellikle su ekstraksiyonu yapılmaktadır. Temizleme işleme örnek hazırlama aşamasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Temizleme işlemi mümkün olduğunca kolay, güvenilir ve farklı gıda çeşitlerine uygulanabilir olmalıdır (Hoenicke et al., 2004). Birçok temizleme

aşaması birkaç katı faz ekstraksiyonunun kombinasyonundan oluşmaktadır (Wenzl et al, 2003).

2.6.1. LC-MS/MS Yöntemi İle Akrilamid Analizi

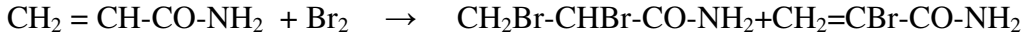
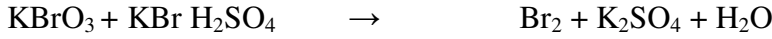
Öğütülen örnekten su, metanol, formik asit ile akrilamidin ekstrakte edilmesi, ekstraktın SPE, Oasis MCX, Oasis HLB, Oasis MAX gibi kartuşlardan geçirilerek saflaştırılması ve LC-MS-MS' e enjekte edilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Zhang et al., 2005; Barutçu et al., 2009; Gökmen and Palazoğlu, 2009).

Akrilamid standart ve iç standart çözeltileri su, asetonitril, seyreltik asetik asit, formik asit, metanol içinde hazırlanmıştır (Chen ve ark., 2008; Barutçu ve ark., 2009; Gökmen ve Palazoğlu, 2009).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarının düşük ayırma kalitesi ve akrilamidin HPLC'de alıkonma süresine göre yeterince iyi belirlenememesi nedeni ile LC-MS esaslı yöntemler geliştirilmiştir (Gertz & Klostermann, 2002). Bu yöntemlerin avantajı türevlendirme yapmadan akrilamidi tespit edebilmeleridir (Pittet et al., 2004; Taeyman et al., 2004). Fakat akrilamidin molekül ağırlığının düşük olması ve düşük kaliteli iyon parçacıkları vermesinden dolayı akrilamidin teşhisinin doğru yapılabilmesi için ikili kütle spektrometrisine (MS-MS) ihtiyaç duyulmaktadır (Pittet et al., 2004; Wenzl et al, 2003; Pedreschi et al., 2006; Eerola et al., 2007). LC-MS/MS MRM (multiple reaction-monitoring) modunda çalışmakta ve MRM ile öncül iyondan oluşan ürün iyon dönüşümü ölçülmektedir. İlk quadropolede oluşturulan pozitif modda ılımlı iyonlaşma ile 71 kütle numaralı akrilamidden 72 kütleli iyon oluşur. İlk quadropolede seçilen bu iyon, 2. quadropolde oluşturulan çarpışma (collision energy) enerjisi ile tekrar iyonlaşır ve 72→55, 72→54, 72→44, 72→27 iyonları oluşur ve 3. quadropolde ölçüm yapılır. Daha yüksek yoğunluk gösterdiği için çoğunlukla hesaplama için 72→55 dönüşümü seçilir. Diğer dönüşümler 72→54, 72→44, 72→27 de doğrulama için kullanılır. Kullanılan izotop etiketli akrilamid iç standartlarından [D₃]- ve [¹³C₃] akrilamid için 75→58 dönüşümü ölçülürken, [¹³C₁] akrilamid için 73→56 dönüşümü ölçülür (Wenzl et al., 2003).

2.6.2. GC, GC-MS, Yöntemi İle Akrilamid Analizi

Gaz Kromatografisi metodu nişasta bakımından zengin örneklerle çalışırken, nişastanın güçlü jelatinizasyon özelliğinden dolayı başarısız olmaktadır. Bunun yanında, GC ile ilgili temizleme, türevlendirme ve standardın stabilitesi hakkında detaylı bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, yüksek kaliteli iyonlar sağlamada GC-MS'den yararlanılan yeni bir metot geliştirilmiştir (Gertz & Klostermann, 2002). Bu yöntemde türevlendirme (bromlama) işleminin kullanılması ile daha uçucu bir bileşik oluşturulmakta ve tanımlama seçiciliği artmaktadır (Wenzl et al., 2003; Pittet et al., 2004; Taeyman et al., 2004). Bromlama ile aynı zamanda, ortamdaki interferans yapan maddeler uzaklaşmakta ve analitin uçuculuğu artmaktadır (Taeyman, 2004). Bromlama işlemi hidrojen bromür (HBr) ve doymuş bromlu su (Br₂) ile yapılmaktadır. Bu bromlama basamağının zahmetli ve zaman alıcı olması nedeni ile alternatif bir bromlama tekniği de potasyum bromat (KBrO₃) ve potasyum bromür (KBr) kullanılarak yapılmaktadır. Potasyum bromür ve potasyum bromat kullanılmasının nedeni, bu bileşikler arasında gerçekleşen yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu ile çok toksik olan element bromu kullanmak yerine brom molekülünü bu şekilde oluşturmaktır.



(akrilamid)

(2,3-dibromopropionamid) (2-bromopropionamid)

Akrilamid türevlendirme işlemi sonunda, çift bağına bromun bağlanması ile 2,3-dibromopropionamide dönüşmektedir (Tareke et. al., 2002).

Yapılan çalışmalarda 1 ile 15 saat arasında farklı sürelerde türevlendirme 4°C ya da 0°C'de buz banyosu içinde yapılmıştır (Wenzl et al., 2003; Zhang et al., 2005; Zou et al., 2008).

Türevlendirme süresinin sonunda bromun fazlası 0,1-1M arasında farklı konsantrasyonlardaki sodyum tiyosülfat çözeltileri ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Çözeltinin sarı-kırmızı arasındaki rengi berraklaşana kadar sodyum tiyosülfat çözeltisi ilave edilmektedir (Wenzl et. al., 2003; Zhang et. al., 2005).

GC-MS yönteminde daha çok pozitif iyon kimyasal iyonizasyon ve impact iyonizasyon içeren kütle spektromeresi kullanarak akrilamid tespit edilmekte ve miktar tayininde de seçilmiş iyon ölçüm (SIM) metodu tercih edilmektedir (Biedermann et al., 2002).

Akrilamid ile ilgili bugüne kadar çok fazla sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, akrilamidin okunduğu iyonlar, dönüştüğü türevler arasında çok farklılıklar bulunmaktadır. Akrilamid ile ilgili GC-MS’de yapılan çalışmalar incelendiğinde; bazı çalışmaların 2-bromopropenamid ($m/z=149$, $m/z=151$) , bazılarının da 2-bromopropiyonamid ($m/z=150$, $m/z=152$) üzerinden hesaplama yapıldığı görülmektedir (Zou et al., 2008; Tareke et. al.,2002).

2.7. Akrilamidle İlgili Yasal Mevzuat

Kodeks Alimentarius ve Türk Gıda Kodeksinde gıdalarda izin verilen maksimum akrilamid miktarıyla ilgili belirlenmiş bir limit bulunmamaktadır. Ancak sularda Avrupa Birliği 98/83/EC direktifi ve ülkemizde 17.02.2005 tarihli resmi gazetede yayımlanan “İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik” gereği 0,1 $\mu\text{g/l}$ yasal sınır değer olarak belirlenmiştir.

2.8. Kumru

Kumru, İzmir’in geleneksel sandviç ekmeğidir. Nohut mayası kullanılarak yapılan bu tombul sandviç bir kuş gövdesine benzeyen boyutları nedeni ile bu ismi almıştır.

Yaklaşık 150 yıldır İzmir’de üretilen ve tüketilen kumru önceleri soğuk olarak tüketilirken, 1940'lardan sonra sandviç gibi arasına sucuk, salam ve peynir konularak sıcak olarak da tüketilmeye başlanmıştır. Sıcak tüketim de kısa sürede İzmir geneline yayılmıştır.

Kumrunun Üretim Biçimi: Kumru, un ve nohut mayası ile hamurun hazırlanması, fermantasyona bırakılması ve şekillendirilerek pişirilmesi ile yapılmaktadır. Nohut mayası bir gün önceden hazırlanır. Nohut mayası yapılırken, nohut havanda dövülür ve üzerine sıcak su ilave edilerek karıştırılır. Kabın ağzı sıkıca kapatılarak, sıcak bir ortamda bekletilir. Genellikle 9-10 saatlik bir mayalanma süresi yeterli olmaktadır. Özellikle kış mevsiminde mayalanma süresi 16 saate kadar uzayabilmektedir. Bir gece bekletildiğinde, nohutlar iyice köpürüp

kabarıp ve nohut mayasının kendine has kokusu oluşmaya başlar. Nohut ve sıcak su karışımının bu şekilde kabarması, nohut mayasının tuttuğunu göstermektedir. Maya ne kadar uzun süre beklerse, sonuç da o kadar güzel olacaktır. Kabaran maya, içindeki taneciklerin iyice parçalanması sağlandıktan sonra, süzülür. Bu süzüntü maya olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, nohut mayası ile hazırlanan unlu mamullerde karbonil bileşiklerinden propiyonaldehit, n-bütiraldehit, etilbütilketonun, uçucu organik asitlerden ise, asetik, propiyonik ve izo-valerik asidin diğer mayalarla hazırlanan unlu mamullere göre daha fazla oranda buldukları tespit edilmiştir (Sıkılı, 2003). Kumru hamuru un, nohut mayası, ılık su ve isteğe göre tuz ile klasik ekmek hamuru gibi yoğrulur. Hamur iyice yoğrulduktan sonra, ortam koşullarına bağlı olarak, iki-üç saat sıcak bir ortamda iki misli kabarana kadar bekletilir. Belli büyüklükte kesilen hamurlara teker teker, önce oval, sonra ortası biraz daha kalınca, kenarları daha ince ve hafif kalkık olan, kumru şekli verilir. Fırın tepsisine aralıklı olarak yerleştirilip,



mayalanma sürecinin tamamlanması (tepsi mayası) için 10-15 dakika daha bekletilir. Hamurların üzerine bıçakla hafif derinlikte, verev çizikler atılır. Kumrular, önceden ısıtılmış olan yaklaşık 300-325°C sıcaklıktaki taş

fırınlarda 7-8 dk. pişirilir. Kumru sandviçi hazırlamak için pişirilen kumrular bir gün bekletildiğinde lezzeti artmaktadır (Alpözen, E. ve Güven, G., 2009).

2.9. Boyoz

Boyoz, İzmirliilerin sabah evden çıktıklarında karşılaştıkları bir Ege klasiğidir. Boyoz, çoğunlukla haşlanmış yumurta ile birlikte satılır ve tüketilir. Boyoz, yağlı ve yağsız olarak 2 şekilde üretilmektedir. Yüzyıllardır İzmir ve çevresinde tüketilen boyoz aslında bir Musevi yiyeceğidir. Geçmişte “Cumartesi Yemeği” olarak da bilinen “Yahudi Böreği” dir. Araştırmalar boyozun kökeninin Sefarad kültürüne dayandığını göstermektedir.

Sefarad Yahudileri, Ege Bölgesi başta olmak üzere İstanbul ve Anadolu'nun pek çok yerine dağıldıklarında boyozu Anadolu halkına tanıtmışlardır. Ama sadece İzmir ve çevresinde beğenilip, ticari bir ürün haline gelebilmiştir.

Boyoz ustaları arasında en ünlüsü efsanevi Boyozcu Avram'dı. Kemeraltı'nda bulunan fırınında yaptığı boyozlar halk arasında çok ünlü idi. Boyoz kelimesinin kökeninin İspanyolca'daki "Bollos" kelimesinden geldiği düşünülmektedir. Bu kelimenin okunuşu "boyos" şeklindedir. Günümüzde, İspanya'da, Güney Amerika Ülkelerinden Şili, Arjantin ve Peru'da yaygın olarak tüketilen boyoz, bizden farklı olarak şekerli olarak da üretilmektedir. Sonuç olarak, boyoz İzmir ve Ege kültürünün ayrılmaz bir parçasıdır .



Boyozun Üretim Biçimi: Un, su, sirke, limon suyu ve tuz ile hamur yapılır ve bir saat dinlendirilir. Derin bir kaba bir miktar bitkisel sıvı yağ konur. Yumuşak kıvamlı hamurdan ceviz büyüklüğünde parçalar kopartılarak bu yağ içerisinde 10 dakika bekletilir. Hamur topağı yağdan alınıp elle, katmer hamuru inceliğinde ve yuvarlak olarak açılır. Önceden 200°C ye ısıtılmış fırında 20 dakika pişirilir (Alpözen, E. ve Güven, G., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kullanılan Kimyasallar:

Akrilamid standardı (Sigma), D₃-akrilamid (Polymer Source), HPLC saflıkta su (VWR), LC/MS-MS saflıkta su (Fluka), potasyum hexasiyanoferrat trihidrat (Merck), çinko asetat dihidrat (Merck), HCl (Sigma-Aldrich), hegzan (Merck), metanol (Sigma-Aldrich), formik asit (Merck) kullanılmıştır.

Kullanılan Standartlar

Akrilamid: Sigma Aldrich, A3553-100G

D₃ Akrilamid (İç standart): Polymer Source

Früktoz: Merck,

Glukoz: Merck,

Kullanılan Örnekler:

Kumru örnekleri Çeşme merkez, Alaçatı, Ilıca ve İzmir merkezdeki üretim yerlerinden, boyoz örnekleri de İzmir merkezdeki 20 farklı yerden üçer adet olarak alınmıştır. Bu örneklerde akrilamid (ppb), invert şeker (glukoz ve früktoz) (ppm), nem (%) (w/w), protein (%) (w/w), pH, renk değerleri L*, a*, b* belirlenmiştir.

Kullanılan Cihazlar:

- **LC/MS-MS Cihazı:** Akrilamid analizleri Agilent 1200 likit kromatografi ve buna bağlı 6410 Triple Quad MS-MS cihazında yapılmıştır.
- **Leco FP-528 Protein Analiz Cihazı:** Kumru ve Boyoz örneklerinin protein miktarını belirlemek için kullanılmıştır.
- **HPLC-RID:** Kumru ve Boyoz örneklerinin indirgen şeker (glukoz, früktoz) miktarlarını belirlemek amacıyla Agilent 1100 HPLC cihazı ve Refraktif Index Dedektörü kullanılmıştır.

- **pH metre:** Sartorius marka pH metre kumru ve boyoz örneklerinin pH'sını belirlemede kullanılmıştır.
- **Etüv:** Nüve marka etüv kumru ve boyoz örneklerinin nem içeriğini belirlemek için kullanılmıştır.
- **Manyetik karıştırıcı :** Kermanlar ve MK 120 marka manyetik karıştırıcı kumru ve boyoz örneklerinde akrilamid analizi için örnek hazırlama işleminde kullanılmıştır.
- **Hunter Renk Ölçer:** Hunterlab (Model: Colorflex) marka renk cihazı kumru ve boyoz örneklerinin renk değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
- **Santrifüj:** Eppendorf marka santrifüj cihazı (5804) kumru ve boyoz örneklerinde akrilamid, invert şeker analizleri için örnek hazırlama işleminde kullanılmıştır.
- **Vorteks Karıştırıcı:** Velp Scientifica marka vorteks karıştırıcı kumru ve boyoz örneklerinde invert şeker analizlerinde ekstraksiyonun sağlanmasında kullanılmıştır.
- **Analitik terazi :** Sartorius marka analitik terazi (CP 224) tüm tartım işlemlerinde kullanılmıştır.
- **Buzdolabı :** Analiz edilen örneklerin ve hazırlanan çözeltilerin saklanması için Beko marka buzdolabı kullanılmıştır.

3.2. Metot

Kumru ve boyoz örneklerinde akrilamid, protein, indirgen şeker, nem, renk ve pH analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Akrilamid Analizi

3.2.1.1 Akrilamid Standartlarının Hazırlanması:

Akrilamid analizinde en uygun yöntemin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen yöntem çalışmalarında kullanılmak üzere akrilamid ve D₃ akrilamid çözeltileri stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla, 25 mg standart ve iç standart tartılıp, asetonitril ile 100 ml'ye tamamlanarak, 250 ppm'lik ana stok çözeltiler hazırlanmıştır ve -18°C'de muhafaza edilmiştir. Böylelikle stok

çözeltilerin dayanıklılığı arttırılmıştır. Bu stok çözeltilerden 0,4 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak, 1 ppm'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. 1 ppm'lik stok akrilamid çözeltilerinden Çizelge 3.1.'de belirtilen hacimlerde alınıp, üzerine 1 ppm'lik stok iç standarttan 2 ml ilave edilip, standardın pH'sı 2,3 civarında olacak şekilde 3-4 damla derişik hidroklorik asit damlatılarak, saf suyla 25 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 3.1. Akrilamid standartlarının (25 ml suda) hazırlanmasında kullanılan stok standart çözelti miktarları ve standartların konsantrasyonları

Akrilamid Standardının Konsantrasyonu	Alınan Stok Akrilamid (1 mg/kg)Hacmi (ml)	Alınan Stok İç Standart (1 mg/kg)Hacmi (ml)	İç Standart Konsantrasyonu
1 ppb	0,025	2	80 ppb
2 ppb	0,05	2	80 ppb
5 ppb	0,125	2	80 ppb
10 ppb	0,25	2	80 ppb
25 ppb	0,625	2	80 ppb
50 ppb	1,25	2	80 ppb
100 ppb	2,5	2	80 ppb

250 ppm'lik stok standart çözeltiler -18°C'da, 1ppm'lik stok çözeltiler ise +4°C'da bekletilmiştir. 1 ppm'lik standart çözeltiler 2 günden fazla kullanılmamıştır.

3.2.1.2. Akrilamid Analizi İçin Örnek Hazırlama

Akrilamid analizinde Palazoğlu ve Gökmen (2010) tarafından kullanılan yöntem üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak yeni bir yöntem oluşturulmuştur.

Öğütülmüş örneklerden 6 gram bir behere tartılıp, üzerine 30 ml HPLC saflıkta su ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin 25. dakikasında büyük moleküllü bileşikleri çöktürmek için 1,5 ml Karez I (10,6 g potasyum hexasiyanoferrat trihidrat/100 ml su) ve 1,5 ml Karez II (24 g çinko asetat dihidrat/100 ml su) çözeltisi ilave edilmiştir. Beher 3

ml su ile yıkanarak, çözelti santrifüj tüpüne alınmış, 10000 devir/dk'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında sıvı faz ayırma hunisine alınmış, 20 ml hegzan ile çalkalanarak, örneğin yağı uzaklaştırılmıştır. Boyoz daha yağlı olduğu için bu işlem boyozda iki kez tekrarlanmıştır. Yağı uzaklaştırılmış bu sulu fazdan 20 ml ekstrakt, 25 ml'lik balon jöjeye alınır, üzerine 1 ppm'lik iç standart çözeltisinden 2 ml ilave edilir ve derişik HCl damlatılarak pH'sı 2,3 civarına ayarlanır. 25 ml'ye saf su ile tamamlanır.

3.2.1.3. Saflaştırma

Elde edilen ekstrakt kartuştan geçirmek suretiyle saflaştırılır. Waters Oasis MCX kartuş önce şartlandırılır. Bunun için önce 1 ml metanol saniyede bir damla akacak şekilde kartuştan geçirilir, sonrasında HPLC saflıkta 1 ml su aynı şekilde kartuştan geçirilir. Bundan sonra kartuşta fiziksel olarak tutunmuş olan sıvı fazı uzaklaştırmak için enjektör boş basılarak hava geçirilir. Böylelikle örnekte veya standartta seyrelmeye yol açacak sıvı uzaklaştırılır. Bu aşamada kartuş kullanıma hazırdır ve 1 ml örnek ekstraktı saniyede bir damla olacak şekilde kartuştan geçirilir ve ilk 10 damla atılır, sonraki damlalar vialle alınır. LC/MS-MS cihazına enjeksiyon yapılır.

3.2.1.4. Yöntemin Saptama Limitinin Belirlenmesi

Piyasadan temin edilen 8 adet kumru numunesinin içi ve kabuğu ayrılmış, kumrunun içi tanık örnek olarak analiz edilmek üzere öğütülmüştür. 6 gram örnek alınarak akrilamid ekstrakte edilmiş, bu ekstraktın 20 ml'si üzerine 1 ppm akrilamid çözeltisinden 0,05 ml, 1 ppm'lik D₃ akrilamid çözeltisinden 2 ml ilave edilmiş, pH 2,3'e ayarlanmış ve saf suyla 25 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.1.5. Geri Kazanım Değerlerinin Belirlenmesi

Piyasadan temin edilen kumru numunelerinden 5 tanesi üzerinde geri kazanım çalışılmıştır. Kumru örneklerinden 6 g alınarak akrilamid analizleri yapılmıştır. Geri kazanımda ise 20 ml örnek ekstraktı üzerine 1 ppm'lik akrilamid çözeltisinden 125 µl ilave edilmiş ve aynı şekilde analiz edilmiştir. Analizler her bir kumru için 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.6. Kromatografik Koşullar

Mobil Faz Akış hızı: 0,8 ml/dk

Pompa: Binary pompa

Enjeksiyon miktarı: 15 µl

Kolon: Agilent SB C18 1,8 µm 4,6 x 50 mm

Mobil Faz: %0,3' lük formik asit-su (%90 oranında)

Asetonitril (%10 oranında)

Analiz Süresi: 2 dk.

Çizelge 3.2. LC-MS/MS cihazında akrilamidden ve D₃ akrilamidden oluşan iyonlar

	I.Quadrupole Oluşan parçacık (M+1)	II.Quadrupole Oluşan parçacık	Fragmentor (eV)	Collusion Energy (eV)
D ₃ Akrilamid (iç standart)	75,1	58,0	60	10
Akrilamid daughter ion	72,1	55,2	70	10
Akrilamid daughter ion	72,1	54,7	70	10

Source Parametreleri

İyonlaşma türü: Elektrospray iyonizasyon

Gaz Sıcaklığı: 350°C

Gaz Akış hızı: 12 l/dk

Nebulizer: 40 psi

Kapillary: 4000 volt

3.2.2. Gerçekleştirilen Diğer Analizler

3.2.2.1. pH Analizi

pH analizleri TS 12230'a göre yapılmıştır. Öğütülerek toz hale getirilmiş kumru ve boyoz örneklerinden 4 g tartılıp 50 ml saf su ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra pH metre kullanılarak her bir örneğin pH'sı 3 paralel olacak şekilde saptanmıştır.

3.2.2.2. Nem Analizi

Kumru ve boyozda nem tayini TS 1135 ISO 712'e göre yapılmıştır. Buna göre; temiz ve kuru metal nem kapları 130°C'de sabit tartıma gelinceye kadar bekletilir. Desikatörde soğutulan ve darası alınan bu kaplara 4 g örnek tartılarak 130°C'de sabit tartıma gelinceye kadar bekletilmiştir.

3.2.2.3. Protein Analizi

Kumru ve boyozda protein analizi AOAC 990.03.2000'e göre Leco FP – 528 cihazı ile yapılmıştır. Dumas prensibi ile çalışan bu sisteme göre; hazır olarak satın alınan alüminyum folyolara 0,25 g örnek tartılır ve cihazda 3 dakikada % Azot (N) olarak sonuç alınır ve bu sonuç hububatlara ait değer olan 5,700 ile çarpılarak % protein sonucu cihaz tarafından otomatik olarak verilir.

3.2.2.4. İndirgen Şeker Analizi:

İndirgen şeker analizleri IHC (International Honey Commission) 2002 yöntemi üzerinde gerekli değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Öğütülerek homojenize edilmiş kumru ve boyoz örneklerinden santrifüj tüpü içersine 3 g tartılır, üzerine kumru için 9 ml, boyoz için 8 ml saf su ilave edilir ve vorteks karıştırıcıda 5 dk karıştırılır. Ardından kumru örnekleri 10000 devir/dk'da oda sıcaklığında 10 dk. santrifüj edilir, boyoz örnekleri de yapısındaki yüksek miktardaki yağ sebebiyle + 4°C'de 5000 devir/dk'da 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz kaba filtreden süzölmüş ve ardından bu süzöntü 0,45 µm'lik teflon filtreden enjektör yardımıyla süzülerek vialere alınmıştır. HPLC (Agilent 1100, U.S.A) cihazında refraktif indeks dedektör ve Zorbax (NH₂) kolonu (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz %85 asetonitril %15 deiyonize su karışımıdır. Kolon sıcaklığı 30°C ve mobil faz akış hızı 1 ml/dk' dır. Enjeksiyon hacmi 20 µl' dir.

3.2.2.5. Renk Analizi

Kumru ve boyozda L*, a*, b* renk değerleri Hunterlab (Model: Colorflex) renk tayin cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Aynı örnek için 4 ayrı noktadan ölçüm alınmıştır.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için varyans analizi (One-way-ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Farklılığın derecesini belirlemek için Duncan testi uygulanmıştır. Bu analizlerde %95 güven seviyesi ($P<0,05$) dikkate alınmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonun belirlenebilmesi için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon analizinde %95 ve %99 güven seviyeleri ($P<0,05$; $P<0,01$) dikkate alınmıştır.

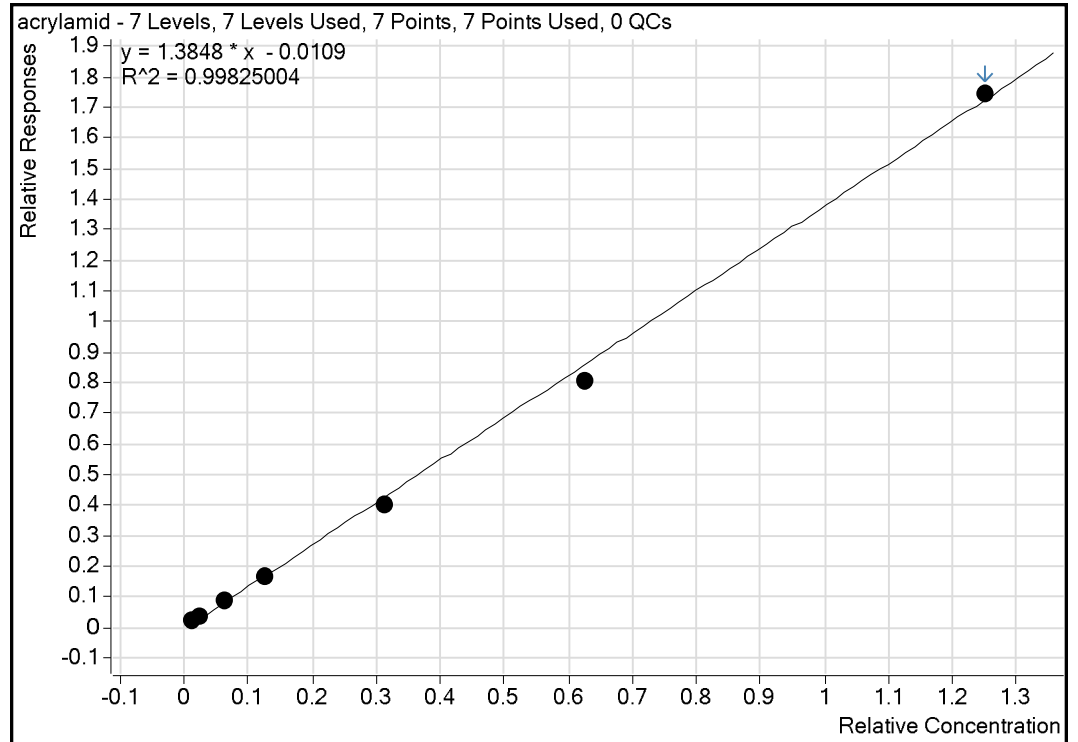
4. BULGULAR

Kumru ve boyozda akrilamid düzeyini belirlemek için LC/MS-MS'de pratik, kısa ve kesin bir metod oluşturulmuştur. Ayrıca İzmir'deki 20 farklı üretim yerinden alınan kumru ve boyoz örneklerinde; akrilamid miktarı, protein, indirgen şeker, nem, pH, L* a* b* değerleri belirlenmiştir.

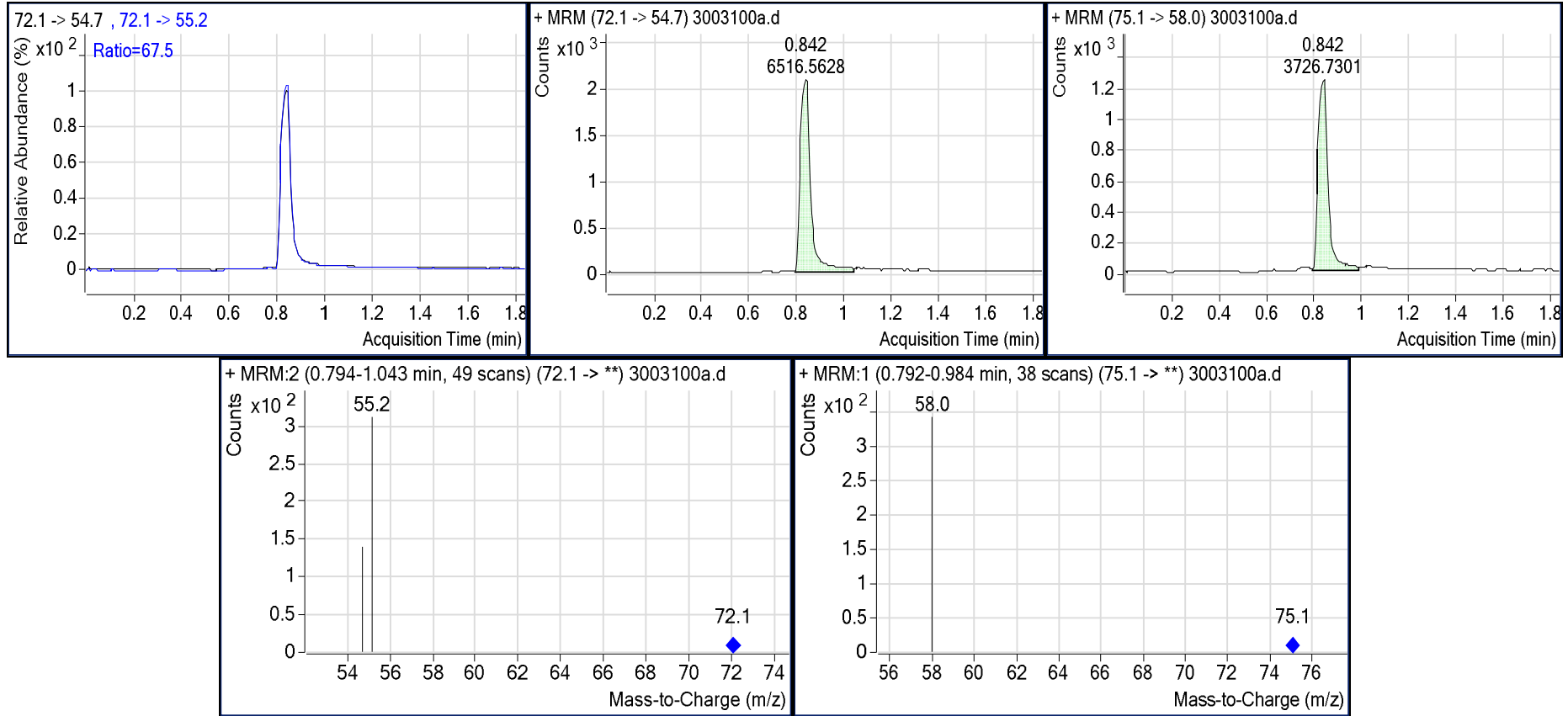
4.1. LC/MS-MS'de Akrilamid Analiz Sonuçları

İç standart yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ppb konsantrasyonlarında akrilamid standartları hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Kalibrasyon eğrisi, y ekseninde akrilamid standart alanı/akrilamid iç standart alanı, x ekseninde ise akrilamid konsantrasyonu/akrilamid iç standart konsantrasyonu olacak şekilde çizilmiştir.



Şekil 4.1. Akrilamid standartları için çizilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.2. Akrilamid standardı ve D₃ Akrilamide ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu

Şekil 4.2’de üstte solda I. quadropolde elde edilen 72,1 kütleli parçacığın II. quadropolde verdiği 55,2 kütleli parçalanma ürününün ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$) piki görülmektedir. Üstte ortada ise, I. quadropolde elde edilen 72,1 kütleli parçacığın II. quadropolde verdiği 54,7 kütleli ($\text{C}_3\text{H}_2\text{NH}_2$) pik görülmektedir. Üstte sağda ise D₃ akrilamid için 75,1 kütleli ana parçacıktan oluşan 58 kütleli parçacığın ($\text{CD}_2=\text{CD}-\text{C}=\text{O}$) piki görülmektedir. Altta solda 72 kütleli ana parçacıktan II. quadropolde elde edilen kütle spektrumu yer almaktadır. Altta sağda ise 75,1 kütleli D₃ akrilamidden oluşan ana parçacığın II. quadropolde verdiği kütle spektrumu görülmektedir.

4.1.1. Yöntem Validasyonu

4.1.1.1. Geri Kazanım Yüzdesinin Belirlenmesi

Geri kazanım yüzdesinin belirlenmesi için kumru örneklerinde çalışılmış ve geri kazanım %99,3 olarak saptanmıştır.

4.1.1.2. Yöntemin Saptama Limitinin Belirlenmesi

Akrilamid saptama limitinin belirlenmesi için 8 adet kumru örneği alınmış, kumrunun içi ve kabuğu ayrılarak kumrunun içi tanık olarak kullanılmıştır. Tanık deney ortalamasının 3 katı saptama sınırı (LOD) olarak, 10 katı da raporlama limiti (LOQ) olarak hesaplanmıştır.

4.2. Kumru Analiz Sonuçları

İzmir Alaçatı ve İzmir merkezden alınan 20 adet kumru örneğinde akrilamid, protein, indirgen şeker; glukoz ve früktoz, pH, nem, L*, a*, b* analizleri gerçekleştirilmiştir. Akrilamid, pH, nem analizleri üçer paralel, protein, indirgen şeker; glukoz ve früktoz analizleri ikişer paralel, L*, a*, b* renk değerleri dört paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Kumruya ait analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.2.1. Kumru Örneklerinde pH

Kumru örneklerinin pH değerleri 5,00-6,13 arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama pH'sı 5,78 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin pH değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

4.2.2. Kumru Örneklerinde Nem

Kumru örneklerinin nem içeriği w/w olarak %25,85 ile %36,82 arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama nem içeriği %32,34 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin nem içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1'de görülmektedir.

4.2.3. Kumru Örneklerinde Renk Değerleri; L*, a*, b*

Kumru örneklerinin L* değerleri 62,99 ile 76,62 arasında değişmektedir. Ortalama L* değeri 71,30 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin L* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

Kumru örneklerinin a* değerleri 3,72 ile 7,94 arasında değişmektedir. Ortalama a* değeri 5,63 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin a* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

Kumru örneklerinin b* değerleri 22,87 ile 26,21 arasında değişmektedir. Ortalama b* değeri 24,43 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin b* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

4.2.4. Kumru Örneklerinde Protein

Kumru örneklerinin protein miktarı w/w olarak %7,09 ile %9,17 arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama protein miktarı %8,19 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin protein içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

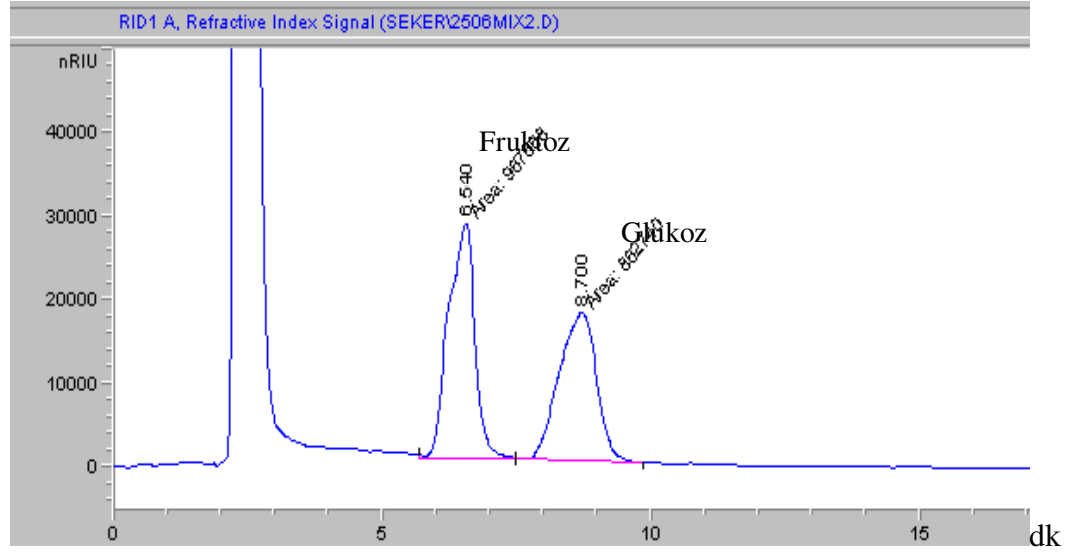
4.2.5. Kumru Örneklerinde İndirgen Şeker

Kumru örneklerinin glukoz miktarı 129,3 mg/kg ile 2813 mg/kg arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama glukoz miktarı 1107 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin glukoz içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

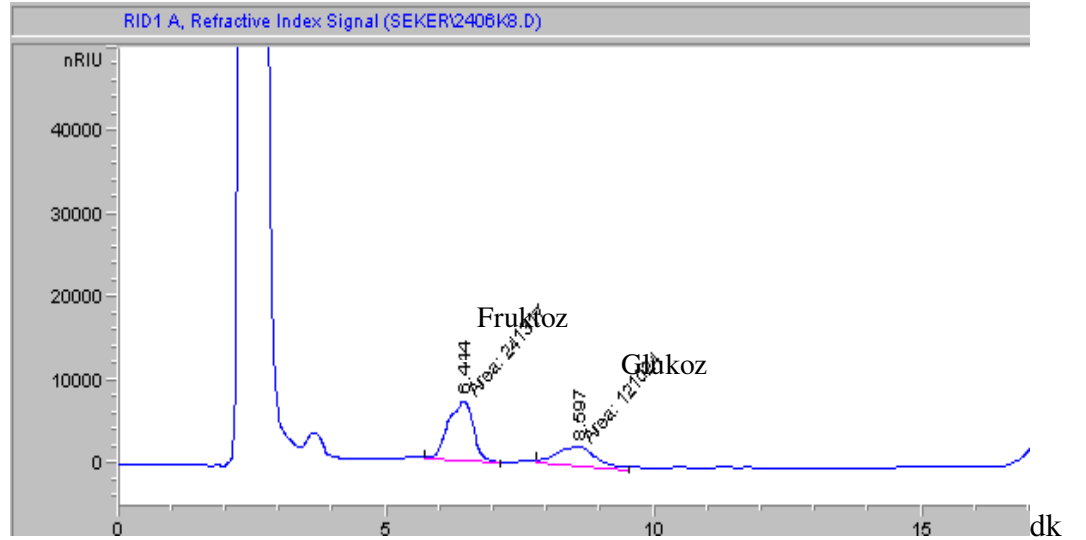
Kumru örneklerinin früktoz miktarı 699,0 mg/kg ile 6813 mg/kg arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama früktoz miktarı 2436 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin früktoz içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir. Şekil 4.3.'de standart glukoz ve

früktoz içeren çözeltinin HPLC kromatogramı, Şekil 4.4.'de ise K8 kodlu örneğe ait kromatogram yer almaktadır.

Kumru örneklerinin indirgen şeker (glukoz+früktoz) miktarı 1291 mg/kg ile 9626 mg/kg arasında bulunmuştur. Kumru örneklerinin ortalama indirgen şeker miktarı 3543 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin toplam indirgen şeker içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.3. Glukoz ve früktoz standardına ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.4. K8 kodlu kumruya ait indirgen şeker kromatogramı (glukoz, früktoz)

4.2.6. Kumru Örneklerinde Akrilamid

İzmir'deki üreticilerden alınan 20 farklı kumru örneğinde 3 paralel olarak akrilamid analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar hesaplanırken iç standart yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucunda her bir örneğin akrilamid içeriği $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak hesaplanmıştır ve bu sonuçlar Çizelge 4.1.'de görülmektedir. K7, K9, K14 ve K18 kodlu kumru örneklerine ait kromotogramlar ve kütle spektrumları Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de görülmektedir.

Kumru örneklerinin akrilamid konsantrasyonu $18,84 \mu\text{g}/\text{kg}$ ile $63,98 \mu\text{g}/\text{kg}$ arasında tespit edilmiştir. Kumru örneklerinin ortalama akrilamid konsantrasyonu $35,11 \mu\text{g}/\text{kg}$ olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda kumru örneklerinin akrilamid konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de görülmektedir.

Pearson korelasyon testi sonucuna göre kumru örneklerinde bulunan akrilamid konsantrasyonu ile protein miktarı arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,05$, $r = 0,531$). Akrilamid ve nem değerleri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,05$, $r = -0,474$). Yani nem içeriği yüksek olan örneğin akrilamid konsantrasyonu düşük bulunmuştur. Akrilamid ve renk değerleri arasında da anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,01$). Akrilamid ve aydınlık değeri L^* değeri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunurken ($P<0,01$, $r = -0,796$), akrilamid ve a^* değeri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuş ($P<0,01$, $r = 0,770$), akrilamid ve b^* değeri arasında da yine pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,01$, $r = 0,620$). Kumru örneklerinde akrilamid konsantrasyonu ile glukoz, früktoz, indirgen şeker ve pH değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($P<0,05$; $P<0,01$).

Curtis et. al. (2010) farklı ülkelerde 2005 ve 2007 yılları arasında hasat edilen pirinçlerden elde edilen pirinç ununa 180°C 'de 20 dk ısıl işlem uygulamışlar ve asparagin ile akrilamid arasında yüksek bir korelasyon ($r = 0,958$, $P<0,001$), akrilamid ve toplam şeker arasında yüksek korelasyon ($r = 0,838$, $P=0,001$), akrilamid ve früktoz arasında korelasyon ($r = 0,672$, $P=0,024$) bulmuşlardır. Oluşan akrilamid konsantrasyonu ve nem içeriği arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır.

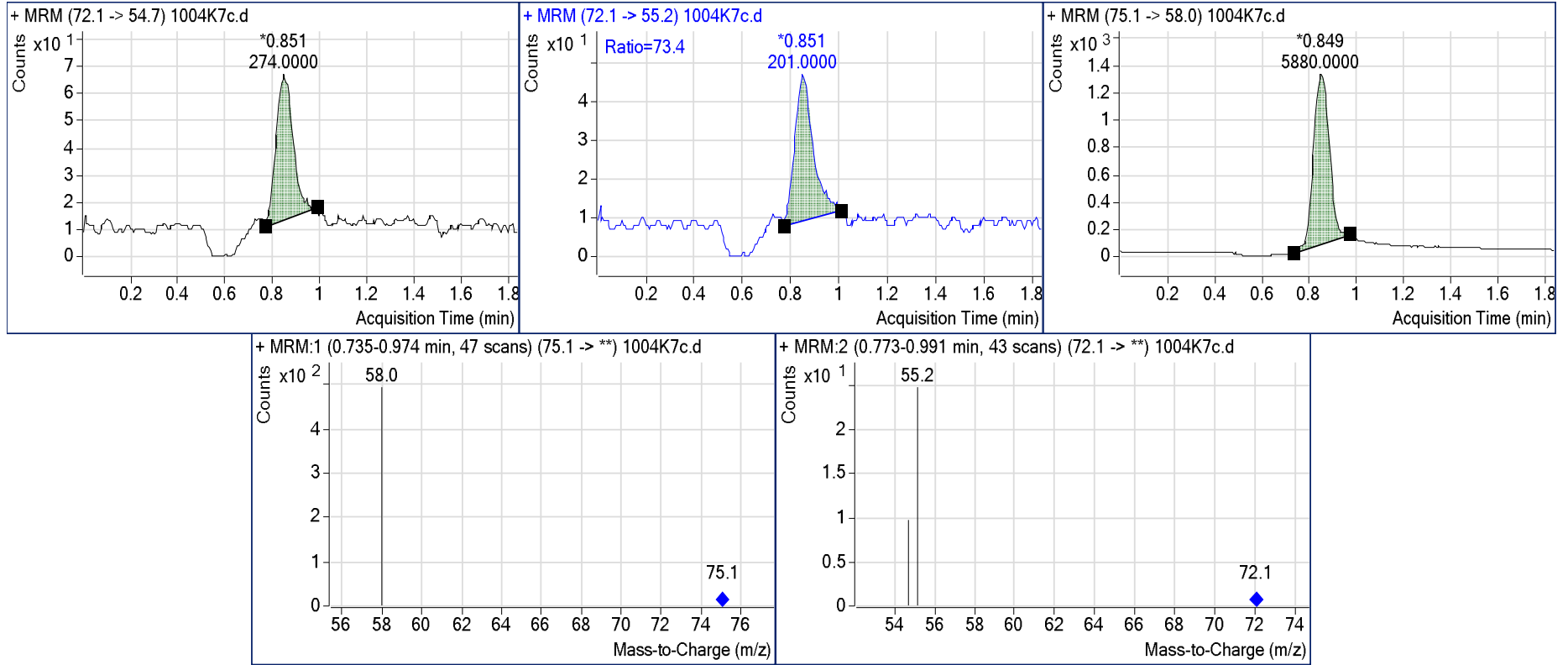
Viklund et. al.(2010) patates kızartmasında yaptıkları çalışmada 180°C’de 2-4,5 dk arasında değişen sürelerde kızartılmış patateslerin renk değerleri ile akrilamid konsantrasyonu arasında korelasyon incelendiğinde akrilamid ile L* arasında negatif yönde (P<0,05, r = -0,92), a* ile pozitif yönde anlamlı bir korelasyon(P<0,05, r = 0.90), b* ile pozitif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,05, r = 0,92) bulmuşlardır. Akrilamid ve nem miktarı arasında negatif yönde (P<0,05, r = -0,96) anlamlı bir korelasyon bulmuşlardır.

Vinci et. al. (2010) patates kızartmasında yaptıkları çalışmada akrilamid konsantrasyonu ile L* arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,01, r = -0,59), a* arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon(P<0,01, r = 0,80), b* arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,05, r = 0,22) bulmuşlardır. Akrilamid ile früktoz konsantrasyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,01, r = 0,83), glukoz konsantrasyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,01, r = 0,65) bulmuşlardır.

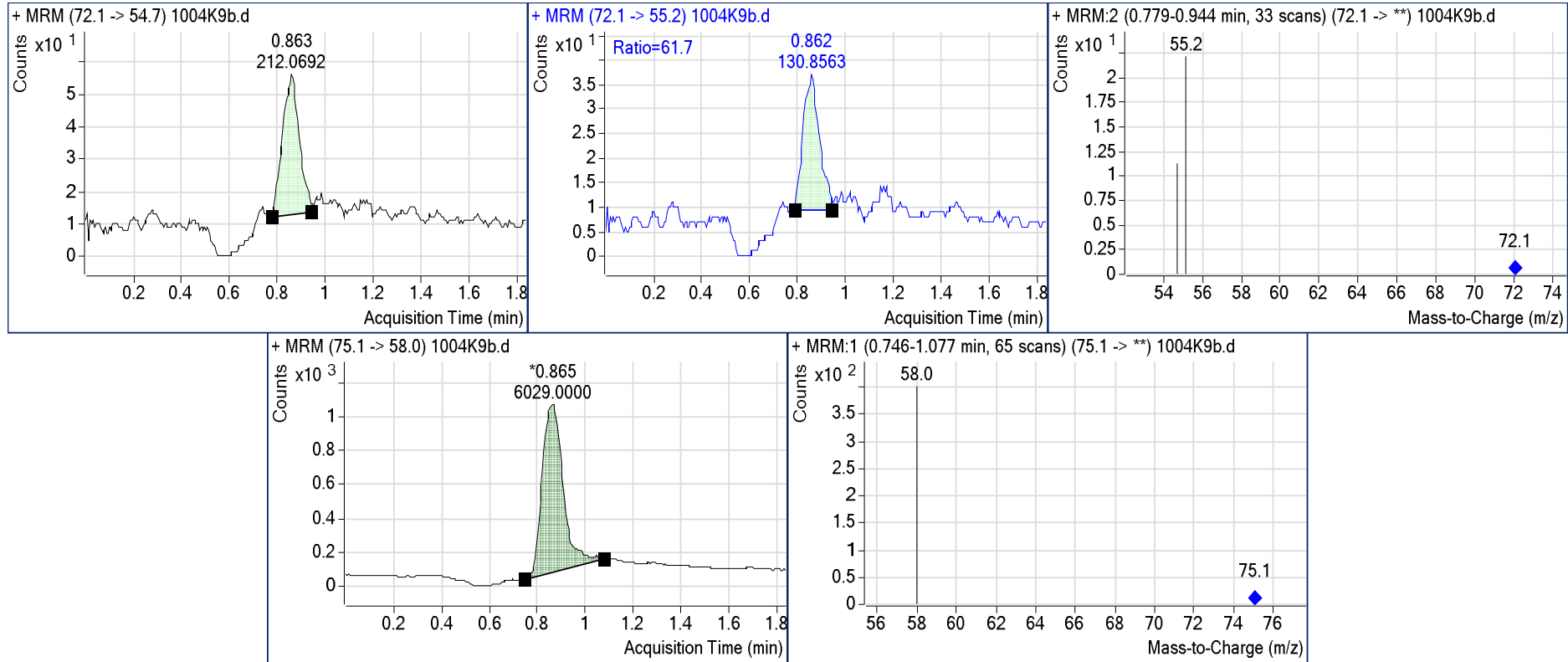
Çizelge 4.1. Kumruda belirlenen akrilamid, protein, glukoz, fruktoz, indirgen şeker, pH, nem ve L*, a*, b* değerleri^a

Örnek No	Akrilamid miktarı (µg/kg)	% Protein (w/w)	Glukoz miktarı (mg/kg)	Früktoz miktarı (mg/kg)	İndirgen şeker miktarı (mg/kg) (Glukoz+Früktoz)	% Nem (w/w)	pH	Renk değerleri		
								L*	a*	b*
1	21,70 ^o ±0,17	7,58 ^l ±0,02	1157,6 ^h ±0,4	3140,8 ^f ±1,0	4298,4 ^e ±1,4	32,53 ^f ±0,07	5,97 ^d ±0,01	73,65 ^h ±0,02	5,29 ^l ±0,02	24,74 ^g ±0,03
2	35,14 ^h ±0,05	7,09 ^b ±0,11	337,7 ^s ±0,4	3348,3 ^d ±0,9	3686,0 ^g ±1,2	35,07 ^c ±0,12	5,81 ^g ±0,01	76,62 ^a ±0	3,72 ^f ±0,01	22,50 ^p ±0,01
3	26,54 ^k ±0,54	7,44 ^{ij} ±0,04	2310,4 ^p ±0,4	3636,9 ^c ±0,2	5947,2 ^b ±0,7	35,84 ^b ±0,40	5,58 ⁿ ±0,01	69,47 ^m ±0,04	5,72 ^g ±0,02	23,90 ^k ±0,04
4	34,93 ^h ±0,28	7,91 ^h ±0,06	659,2 ^o ±0,5	1692,0 ⁿ ±0,2	2351,3 ^g ±0,7	31,89 ^g ±0,06	5,00 ^o ±0	75,07 ^c ±0,03	4,64 ^l ±0,02	23,13 ⁿ ±0,02
5	21,93 ^{no} ±0,40	7,28 ^k ±0,11	673,1 ⁿ ±0,6	3153,2 ^e ±0,3	3826,3 ^f ±0,8	32,64 ^f ±0,23	5,78 ^h ±0,01	74,11 ^f ±0,04	4,50 ⁱ ±0,01	24,21 [±] 0,06
6	24,10 ^m ±0,20	8,17 ^g ±0	2813,0 ^a ±0,6	6813,4 ^a ±0,3	9626,4 ^a ±0,9	34,75 ^c ±0,17	5,61 ^m ±0,01	73,78 ^g ±0,02	5,58 ^h ±0,01	24,08 [±] 0,03
7	18,84 ^p ±0,16	7,90 ^h ±0,14	1504,4 ^d ±0,5	3689,1 ^b ±0,4	5193,5 ^c ±1,0	30,93 ^h ±0,28	6,00 ^b ±0,01	72,6 ⁱ ±0,02	5,71 ^g ±0,01	25,30 ^d ±0,02
8	28,92 ^j ±0,15	7,35 ^l ±0,04	384,0 ^t ±0,4	2239,6 [±] 0,7	2623,7 ^m ±1,1	33,02 ^e ±0,05	5,97 ^d ±0,01	75,46 ^b ±0,02	4,08 ^o ±0,02	23,25 [±] 0,03
9	25,88 ^l ±0,12	8,29 ^{ef} ±0,30	802,0 ^m ±0,5	1630,1 ^o ±0,5	2432,1 ⁿ ±1,0	36,06 ^b ±0,15	5,90 ^e ±0,01	73,75 ^g ±0,03	4,31 ⁿ ±0,01	22,91 ^o ±0,02
10	25,90 ^l ±0,01	8,26 ^{ef} ±0,06	1079,6 ^j ±0,7	1883,0 ^k ±0,1	2962,6 [±] 0,6	34,93 ^c ±0,21	5,97 ^d ±0,01	74,63 ^e ±0,04	3,75 ^p ±0,03	23,19 ^m ±0,01
11	36,47 ^g ±0,32	8,01 ^{gh} ±0,01	1139,2 [±] 0,6	1484,4 ^f ±0,1	2623,6 ^m ±0,7	36,64 ^a ±0,04	5,63 ^l ±0,01	67,68 ^p ±0,24	6,25 ^e ±0,06	23,27 [±] 0,05
12	63,98 ^a ±0,28	8,64 ^{cd} ±0,09	605,6 ^p ±0,3	1606,5 ^p ±0,5	2212,2 ^p ±0,1	30,29 [±] 0,16	5,87 ^f ±0,01	62,99 ^s ±0,04	7,94 ^a ±0,01	26,21 ^b ±0,02
13	48,94 ^d ±0,03	8,79 ^{bc} ±0,06	935,7 ^l ±0,4	2565,7 ^h ±0,4	3501,5 [±] 0,8	33,70 ^d ±0,22	5,91 ^e ±0,01	69,86 ^l ±0,05	6,51 ^d ±0,02	25,15 ^e ±0,04
14	31,09 ⁱ ±0,27	9,17 ^a ±0,09	1189,3 [±] 0,5	691,0 ^t ±0,2	1880,3 ^f ±0,3	32,82 ^{ef} ±0,11	5,99 ^c ±0,01	68,52 ^o ±0,12	6,52 ^d ±0,03	25,51 ^c ±0,08
15	28,51 ^j ±0,23	8,10 ^{gh} ±0,01	129,3 ^l ±0	1161,8 ^s ±0,4	1291,1 ^s ±0,4	36,41 ^a ±0,14	6,13 ^a ±0,01	73,05 [±] 0,02	4,68 ^k ±0,02	24,56 ^h ±0,04
16	61,89 ^c ±0,18	8,84 ^{bc} ±0,01	974,6 ^k ±0,6	2617,6 ^g ±0,7	3592,2 ^h ±0,2	26,01 [±] 0,29	5,70 ^l ±0	66,92 [±] 0,03	7,35 ^b ±0,02	26,20 ^b ±0,04
17	42,92 ^e ±0,72	8,89 ^b ±0	2221,9 ^c ±0,1	2082,3 [±] 0,3	4304,3 ^d ±0,4	25,85 ^l ±0,23	5,65 ^{ki} ±0,01	68,82 ⁿ ±0,03	7,17 ^c ±0,02	26,51 ^a ±0,02
18	22,40 ⁿ ±0,50	8,45 ^{de} ±0,04	1178,5 ^g ±0,4	1822,1 ^m ±0,1	3000,6 ^k ±0,5	29,27 [±] 0,06	5,64 ^{kl} ±0,01	74,75 ^d ±0,01	4,42 ^m ±0,01	22,87 ^o ±0,03
19	39,19 ^f ±0,32	8,92 ^b ±0,05	1456,4 ^e ±0,2	1877,3 [±] 0,8	3333,7 [±] 1,0	27,78 ^k ±0,11	5,65 ^j ±0,01	71,30 ^k ±0,02	5,94 ^f ±0,01	24,91 [±] 0,02
20	62,98 ^b ±0,28	8,64 ^{cd} ±0,09	595,2 ^p ±0,3	1574,3 ^p ±0,4	2169,5 ^p ±0,7	30,29 [±] 0,16	5,87 ^f ±0,01	62,99 ^s ±0,04	7,94 ^a ±0,01	26,21 ^b ±0,02

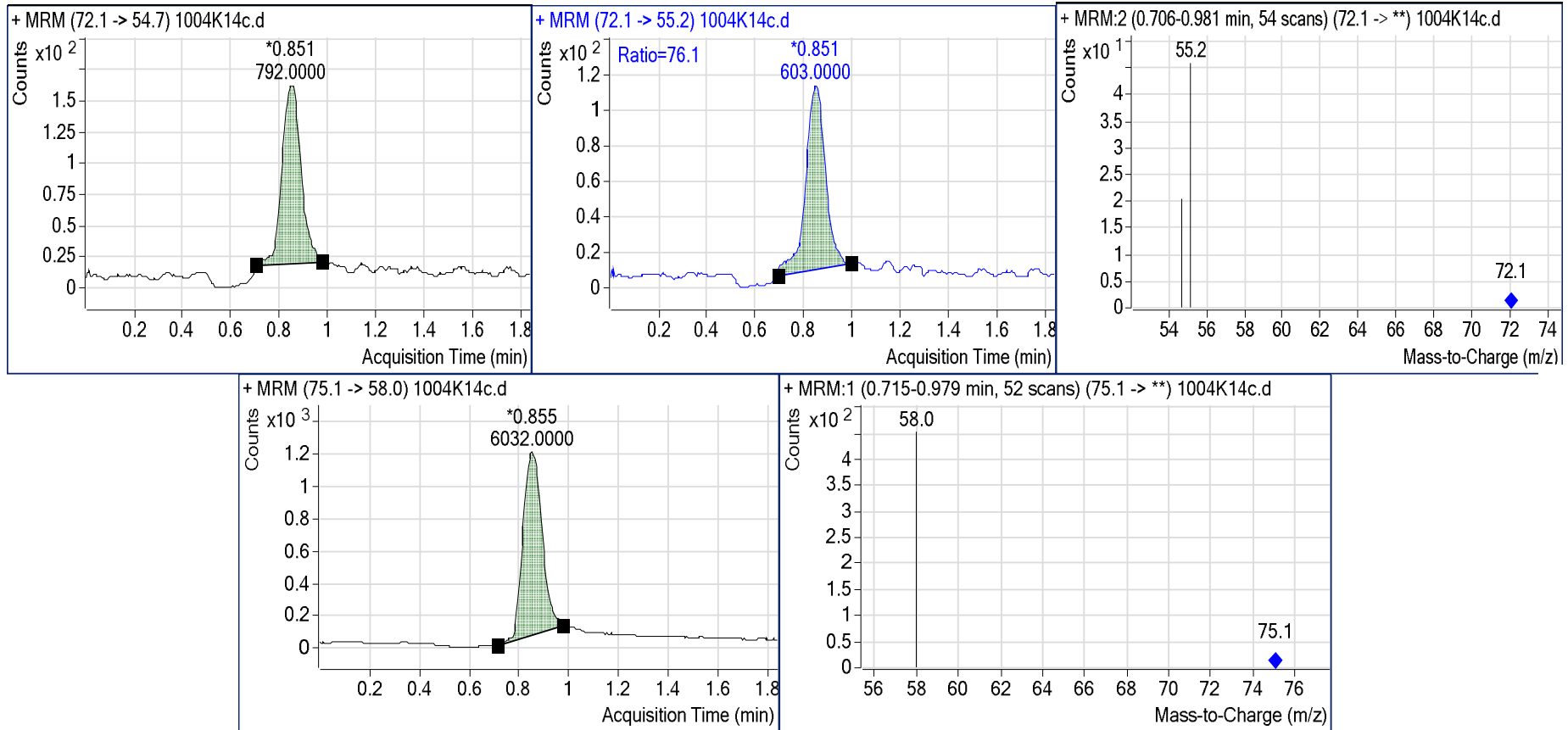
^aAynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.



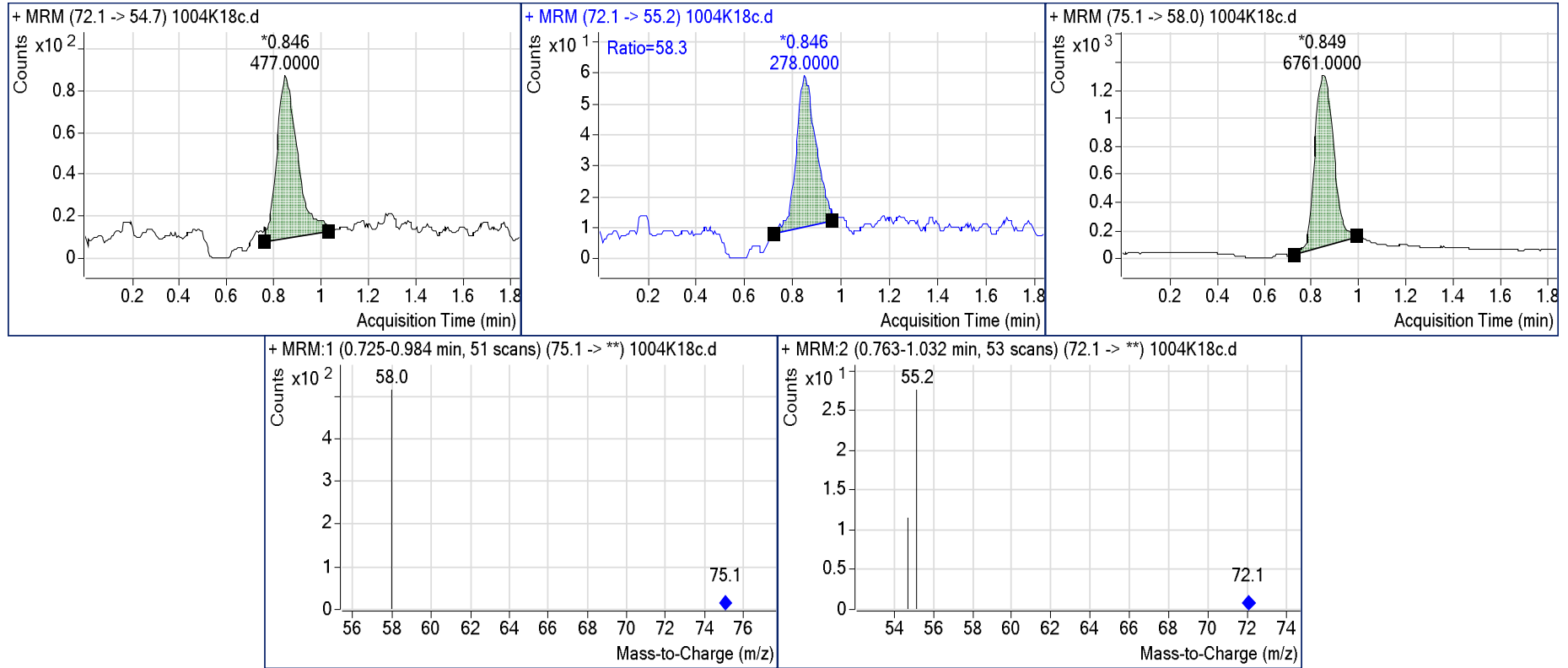
Şekil 4.5. K7 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogram ve spektrumu



Şekil 4.6. K9 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu



Şekil 4.7. K14 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogram ve spektrumu



Şekil 4.8. K18 kodlu kumruya ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu

4.3. Boyoz Analiz Sonuçları

İzmir merkezden alınan 20 adet boyoz örneğinde akrilamid, protein, indirgen şeker; glukoz ve früktoz, pH, nem, L*,a*,b* analizleri gerçekleştirilmiştir. Akrilamid, pH, nem analizleri üçer paralel, protein, indirgen şeker; glukoz ve früktoz analizleri ikişer paralel, L*, a*, b* renk değerleri dört paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Boyoza ait analiz sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

4.3.1. Boyoz Örneklerinde pH

Boyoz örneklerinin pH değerleri 5,63-6,16 arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama pH'sı 6,01 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin pH değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

4.3.2. Boyoz Örneklerinde Nem

Boyoz örneklerinin nem içeriği w/w olarak %16,13 ile %27,76 arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama nem içeriği %22,06 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin nem içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

4.3.3. Boyoz Örneklerinde Renk Değerleri; L*, a*, b*

Boyoz örneklerinin L* değerleri 54,23 ile 70,44 arasında değişmektedir. Ortalama L* değeri 62,71 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin L* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Boyoz örneklerinin a* değerleri 5,42 ile 10,09 arasında değişmektedir. Ortalama a* değeri 7,85 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin a* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Boyoz örneklerinin b^* değerleri 23,88 ile 29,31 arasında değişmektedir. Ortalama b^* değeri 27,04 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin b^* değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

4.3.4. Boyoz Örneklerinde Protein

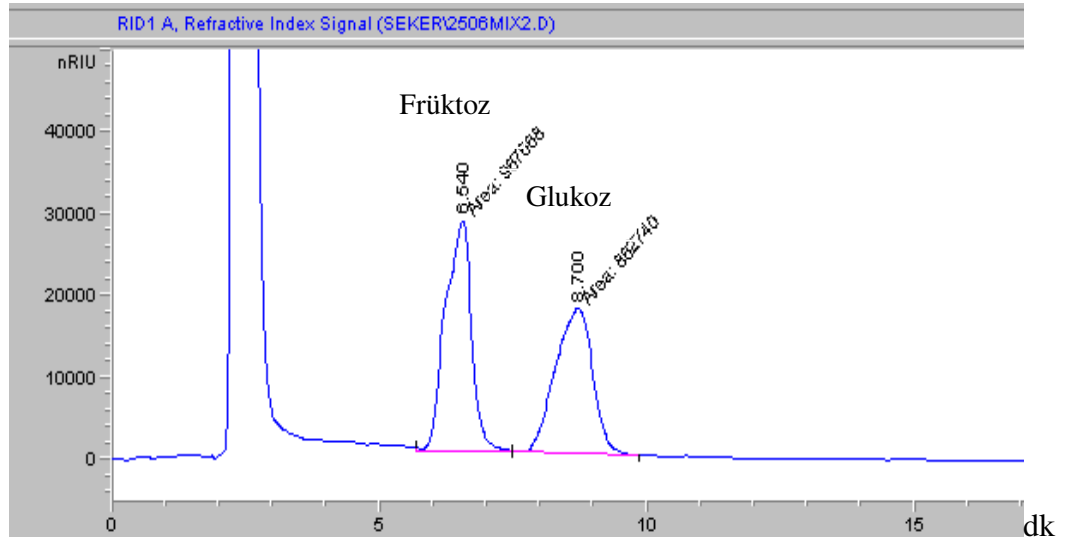
Boyoz örneklerinin protein miktarı w/w olarak %6,41 ile %7,98 arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama protein miktarı %7,31 olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin protein içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

4.3.5. Boyoz Örneklerinde İndirgen Şeker

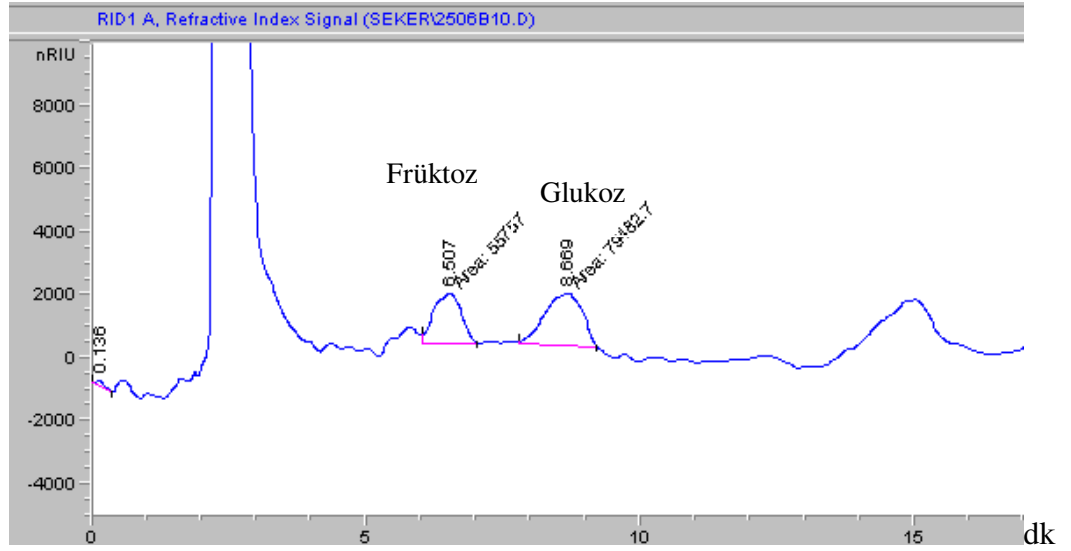
Boyoz örneklerinin glukoz konsantrasyonu 419,6 mg/kg ile 2079 mg/kg arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama glukoz miktarı 1110 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin glukoz içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir. Şekil 4.9.'da standart glukoz ve früktoz içeren çözeltinin HPLC kromatogramı, Şekil 4.10.'de ise B10 kodlu örneğe ait kromatogram yer almaktadır.

Boyoz örneklerinin früktoz konsantrasyonu 636 mg/kg ile 1721 mg/kg arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama früktoz miktarı 1054 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin früktoz içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Boyoz örneklerinin indirgen şeker (glukoz+früktoz) konsantrasyonu 1092 mg/kg ile 3332 mg/kg arasında bulunmuştur. Boyoz örneklerinin ortalama indirgen şeker miktarı 2163 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin toplam indirgen şeker içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.



Şekil 4.9. Glukoz ve Früktöz standartlarına ait HPLC kromotogramı



Şekil 4.10. B10 kodlu boyza ait glukoz ve früktoz kromotogramı

4.3.6. Boyoz Örneklerinde Akrilamid

İzmir'deki üreticilerden alınan 20 farklı boyoz örneğinde 3 paralel olarak akrilamid analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar hesaplanırken iç standart yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarında her bir örneğin akrilamid içeriği $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak hesaplanmıştır ve bu sonuçlar Çizelge 4.2.'de görülmektedir. B4, B7, B8, B9 kodlu boyoz örneklerine ait kromotogramlar ve kütle spektrumları Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'de görülmektedir.

Boyoz örneklerinin akrilamid konsantrasyonu 28,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ile 63,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında tespit edilmiştir. Boyoz örneklerinin ortalama akrilamid konsantrasyonu 42,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda boyoz örneklerinin akrilamid konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

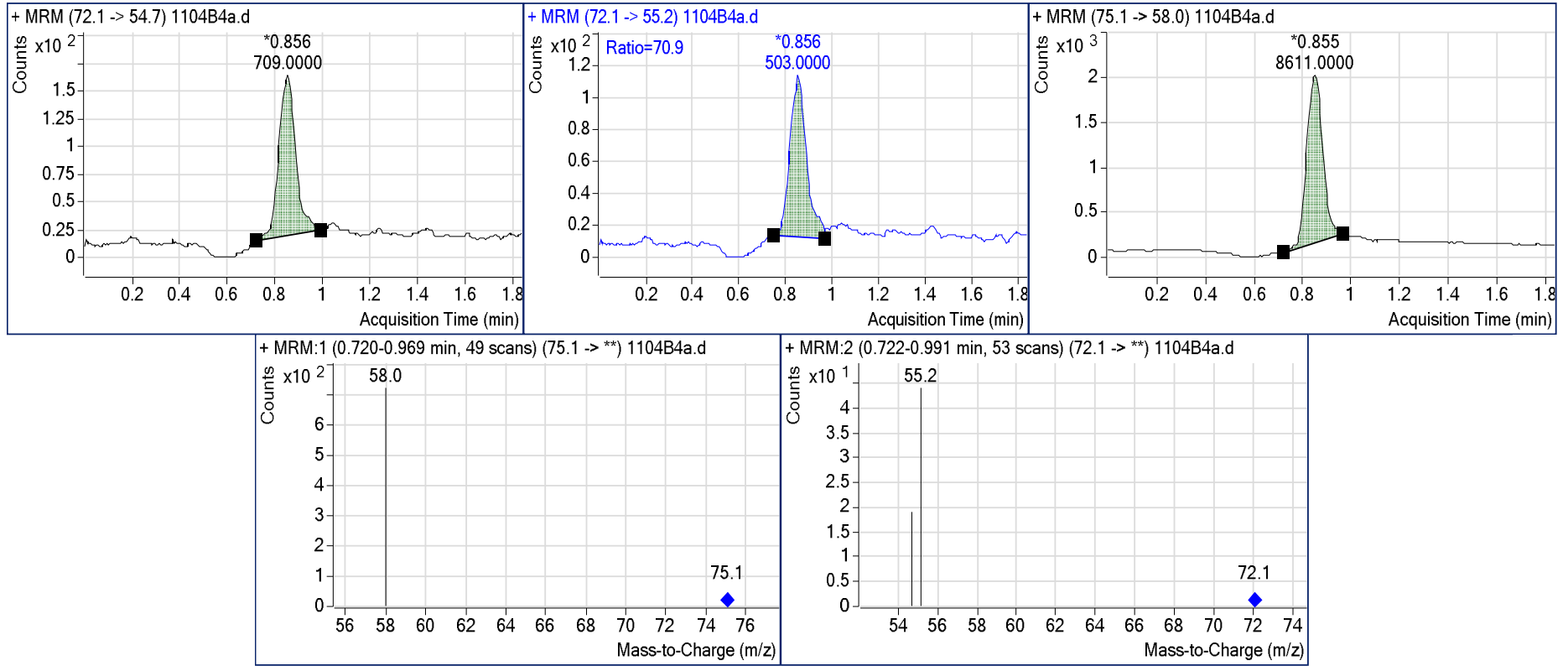
Pearson korelasyon testi sonucuna göre boyoz örneklerinde bulunan akrilamid konsantrasyonu ile protein miktarı arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($P<0,05$; $P<0,01$). Akrilamid ve nem değerleri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,01$, $r = -0,581$). Yani nem içeriği yüksek olan örneğin akrilamid konsantrasyonu düşük bulunmuştur. Akrilamid ve renk değerleri arasında da anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,01$). Akrilamid ve aydınlık değeri L^* arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunurken ($P<0,05$, $r = -0,527$), akrilamid ve a^* değeri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuş ($P<0,05$, $r = 0,452$), akrilamid ve b^* değeri arasında da yine pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($P<0,05$, $r = 0,507$). Boyoz örneklerinde akrilamid konsantrasyonu ile früktoz arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunurken ($P<0,05$, $r = 0,475$), akrilamid konsantrasyonu ile glukoz, indirgen şeker ve pH değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($P<0,05$; $P<0,01$).

Gökmen et al. (2007) tarafından yapılan çalışmada hamur formulasyonunun akrilamid oluşumuna etkileri araştırılmış ve tarife glukoz, fruktoz yerine sakaroz koymanın akrilamid oluşumunu %50 azalttığı, formulasyona sitrik asit ilave edilerek pH 7.40'dan 3.28'e düşürüldüğünde akrilamid konsantrasyonunun % 67 düştüğünü bulmuşlardır.

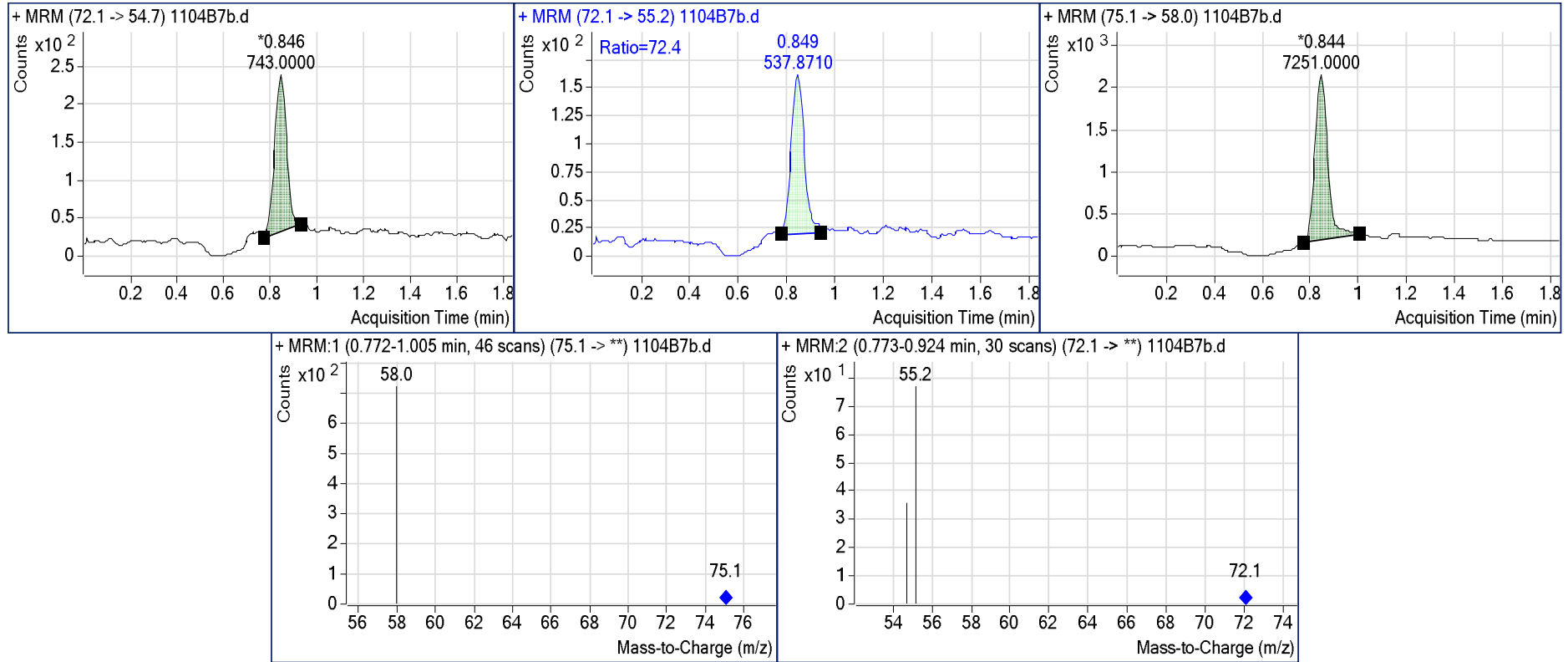
Çizelge 4.2. Boyozda belirlenen akrilamid, % protein, glukoz, fruktoz, indirgen şeker, pH, % nem, L*, a*, b*^a

Örnek No	Akrilamid miktarı (µg/kg)	% Protein (w/w)	Glukoz miktarı (mg/kg)	Fruktoz miktarı (mg/kg)	İndirgen şeker miktarı (mg/kg) (Glukoz+Früktoz)	% Nem (w/w)	pH	Renk değerleri		
								L*	a*	b*
1	48,07 ^d ±0,30	6,41 ^h ±0,04	2078,6 ^a ±1,5	1243,4 ^e ±0,6	3322,1 ^a ±2,2	23,75 ^{de} ±0,19	5,68 ^m ±0	66,28 ^e ±0,11	7,72 ^j ±0,02	28,42 ^d ±0,03
2	33,38 ^{kl} ±0,05	7,33 ^{de} ±0,11	1720,2 ^c ±0,7	1173,9 ^g ±1,3	2894,1 ^b ±2,0	27,7 ^a ±0,16	6,14 ^b ±0,01	66,08 ^g ±0,04	5,49 ^p ±0,04	24,52 ⁿ ±0,05
3	59,46 ^b ±0,07	7,30 ^{de} ±0,38	928,8 ⁿ ±1,3	1501,4 ^c ±0,6	2430,2 ^h ±2,0	16,79 ^m ±0,36	5,95 ^k ±0,01	60,71 ⁿ ±0,026	9,51 ^b ±0,09	28,49 ^c ±0,09
4	36,28±0,22	6,83 ^{fg} ±0,04	1182,4 ^g ±0,9	880,9 ⁿ ±0,5	2063,3 ^k ±0,3	24,19 ^{cd} ±0,52	6,14 ^b ±0	59,83 ^o ±0,03	7,04 ^m ±0,03	23,88 ^o ±0,03
5	46,51 ^e ±0,23	7,38 ^{cd} ±0,06	1282,4 ^e ±1,1	1270,6 ^d ±1,5	2552,9 ^f ±0,4	19,82 ^l ±0,34	5,97 ^l ±0	57,13 ^p ±0,03	10,09 ^a ±0,02	27,65 ^q ±0,03
6	52,19 ^d ±0,19	6,81 ^{fg} ±0,01	1098,6 ^h ±1,0	1700,0 ^b ±1,4	2798,6 ^d ±0,4	16,93 ^m ±0,83	6,03 ^q ±0	55,24 ^r ±0,03	7,85 ^h ±0,03	29,31 ^a ±0,03
7	48,55 ^d ±0,17	7,65 ^{abcd} ±0,08	738,4 ^s ±1,2	779,4 ^t ±1,0	1517,8 ^r ±2,3	22,83 ^{fg} ±0,11	6,16 ^a ±0,01	62,64 ^l ±0,06	8,91 ^e ±0,05	27,71 ^q ±0,05
8	63,53 ^a ±0,13	7,47 ^{cd} ±0,15	1308,7 ^d ±0,5	1206,2 ^l ±0,4	2514,8 ^g ±0,1	17,25 ^m ±0,21	6,03 ^q ±0,01	54,23 ^s ±0,31	8,59 ^f ±0,02	28,37 ^d ±0,02
9	33,62 ^k ±0,31	7,38 ^{cd} ±0,07	977,4 ^l ±0,7	1097,2 ⁱ ±0,9	2074,6 ⁱ ±1,6	22,41 ^{gh} ±0,33	6,13 ^c ±0,01	61,18 ^l ±0,01	7,41 ^k ±0,03	25,07 ^l ±0,04
10	43,33 ^l ±0,16	7,71 ^{abc} ±0,34	1084,6 ^j ±1,1	1720,6 ^a ±0,6	2805,2 ^c ±0,5	24,51 ^c ±0,45	5,88 ^h ±0,01	62,36 ^j ±0,10	7,79 ^j ±0,02	26,67 ^h ±0,06
11	37,60 ⁱ ±0,25	6,98 ^{fg} ±0,05	868,1 ^p ±0,7	635,9 ^u ±0,6	1504,1 ^s ±1,2	23,35 ^{ef} ±0,15	6,02 ^h ±0	66,07 ^g ±0,04	7,80 ^l ±0,02	28,07 ^e ±0,03
12	46,61 ^e ±0,13	6,89 ^{fg} ±0,09	1062,4 ^k ±0,7	911,5 ^j ±0,7	1973,8 ^l ±0	16,13 ⁿ ±0,38	5,97 ^l ±0	69,09 ^b ±0,10	7,28 ^l ±0,05	28,07 ^e ±0,03
13	48,56 ^d ±0,10	7,85 ^{ab} ±0,07	1745,2 ^b ±1,2	885,9 ^m ±0,3	2631,1 ^e ±0,9	27,40 ^{ab} ±0,13	6,04 ^l ±0,01	66,92 ^d ±0,02	6,44 ^o ±0,02	25,84 ^k ±0,01
14	32,63 ^m ±0,12	6,64 ^{gh} ±0,01	665,5 ^t ±0,8	757,4 ^p ±0,8	1422,9 ^t ±1,6	20,49 ^k ±0,20	6,02 ^h ±0	68,93 ^c ±0,04	6,99 ⁿ ±0,02	27,17 ^l ±0,02
15	38,81 ^l ±0,64	7,65 ^{abcd} ±0,04	419,6 ^u ±0,8	672,8 ^l ±1,1	1092,3 ^u ±1,8	22,13 ^h ±0,22	6,10 ^d ±0	61,78 ^k ±0,08	9,01 ^q ±0,01	27,87 ⁱ ±0,05
16	40,18 ^h ±0,05	7,48 ^{cd} ±0,24	953,3 ^m ±0,5	745,8 ^r ±0,8	1699,0 ^p ±1,3	22,53 ^{fg} ±0,12	6,08 ^e ±0	60,96 ^m ±0,06	8,38 ^q ±0,01	27,51 ^h ±0,03
17	36,89 ^j ±0,83	7,87 ^{ab} ±0,04	1270,7 ^s ±0,8	1062,3 ^j ±1,2	2332,9 ⁱ ±2,0	21,58 ⁱ ±0,22	5,99 ^h ±0	61,19 ^l ±0,04	8,88 ^e ±0,01	27,67 ^q ±0,03
18	33,02 ^m ±0,13	7,98 ^a ±0,03	1076,6 ^j ±1,0	712,2 ^s ±1,1	1788,8 ^o ±0,1	21,57 ^l ±0,16	6,04 ^l ±0	63,40 ^h ±0,10	9,06 ^c ±0,06	28,78 ^b ±0,02
19	41,97 ^g ±0,05	7,57 ^{bcd} ±0,12	820,1 ^r ±1,0	1110,0 ^h ±0,2	1930,1 ^m ±0,8	22,73 ^g ±0,11	5,63 ⁿ ±0,01	59,73 ^o ±0,12	7,40 ^k ±0,02	24,66 ^m ±0,06
20	28,33 ⁿ ±0,28	7,02 ^{ef} ±0,17	912,8 ^o ±1,3	1004,2 ^k ±1,2	1917,0 ⁿ ±2,5	27,09 ^b ±0,30	6,10 ^d ±0	70,44 ^a ±0,03	5,42 ^r ±0,03	25,11 ^h ±0,01

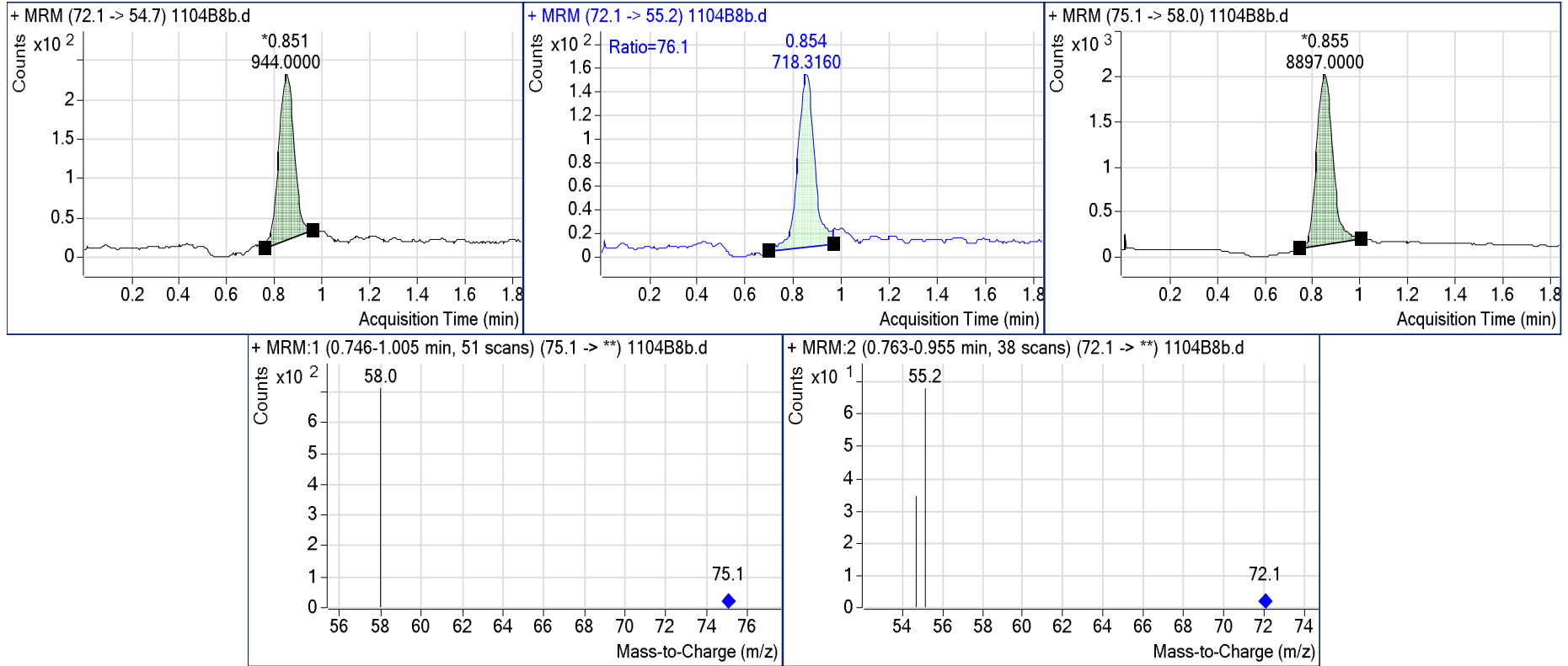
^aAynı sütündeki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.



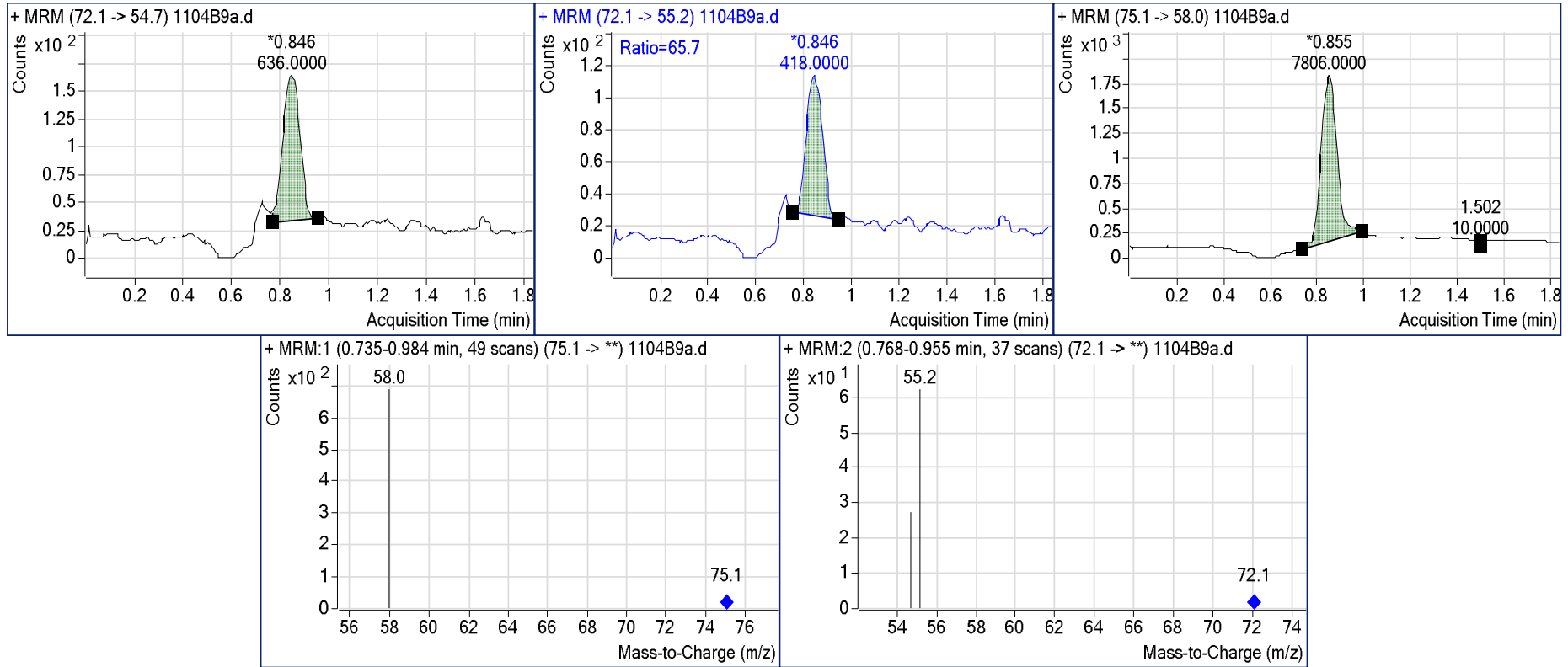
Şekil 4.11. B4 kodlu boyza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu



Şekil 4.12. B7 kodlu boyza ait LC-MS/MS kromatogramı ve spektrumlar



Şekil 4.13. B8 kodlu bozoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu



Şekil 4.14 B9 kodlu boyoza ait LC-MS/MS kromotogramı ve spektrumu

5. SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda akrilamid düzeyini belirlemek için LC-MS/MS' de kısa, pratik ve güvenilir bir metod oluşturulmuştur. Bu yöntem akrilamidin gıdadan su ile ekstraksiyonunu, Oasis MCX kartuş ile saflaştırılması ve LC-MS/MS'de okunmasını kapsar. Bu yöntemde iç standart tekniği kullanılmıştır. İç standart olarak D3 akrilamid kullanılmıştır. Yöntemin geri kazanımı %99,3 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin saptama limiti (LOD) 1,5 µg/kg, raporlama limiti (LOQ) 5,0 µg/kg olarak bulunmuştur.

Geliştirilen bu yöntemle İzmir piyasasından alınan geleneksel ürünlerimizden kumru ve boyozda akrilamid miktarları tespit edilmiştir. Akrilamid analizinin yanı sıra pH, % nem, % protein, L*, a*, b* değerleri, glukoz, früktoz, toplam indirgen şeker analizleri yapılmış ve akrilamid konsantrasyonu ile bu parametreler arasında korelasyon araştırılmıştır.

Kumruda akrilamid konsantrasyonu 18,84 µg/kg ile 63,98 µg/kg arasında değişmektedir. Kumru örneklerinde pH değerleri 5,00 ile 6,13 arasında; nem %25,85 ile %36,82 arasında; protein değerleri %7,09 ile %9,17 arasında; L* değeri 62,99 ile 76,62 aralığında; a* değeri 3,72 ile 7,94 aralığında, b* değeri 22,87 ile 26,21 aralığında; glukoz konsantrasyonu 129,3 mg/kg ile 2813 mg/kg aralığında; früktoz konsantrasyonu 691 mg/kg ile 6813 mg/kg arasında; toplam şeker konsantrasyonu 1291 mg/kg ile 9626 mg/kg arasında saptanmıştır. Kumrudaki akrilamid konsantrasyonu ile % protein miktarı arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,05), akrilamid konsantrasyonu ile % nem arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,05), akrilamid konsantrasyonu ile L* arasında negatif bir korelasyon (P<0,01), akrilamid konsantrasyonu ile a* ve b* değerleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon (P<0,01) bulunurken, akrilamid konsantrasyonu ile pH, glukoz, früktoz, toplam indirgen şeker konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (P<0,05; P<0,01).

Boyozda akrilamid konsantrasyonu 28,33 µg/kg ile 63,53 µg/kg arasında değişmektedir. Boyoz örneklerinde pH değerleri 5,63 ile 6,16 arasında; nem %16,13 ile %27,76 arasında; protein değerleri %6,41 ile %7,98 arasında; L* değeri 54,23 ile 70,44 aralığında; a* değeri 5,42 ile 10,09 aralığında, b* değeri 23,88 ile 29,31 aralığında; glukoz konsantrasyonu 420 mg/kg ile 2079 mg/kg aralığında; früktoz konsantrasyonu 636 mg/kg ile 1720 mg/kg arasında; toplam şeker konsantrasyonu 1092 mg/kg ile 3332 mg/kg arasında saptanmıştır.

Boyozdaki akrilamid konsantrasyonu ile früktoz arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($P<0,05$), akrilamid konsantrasyonu ile % nem arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon ($P<0,01$), akrilamid konsantrasyonu ile L^* arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon ($P<0,01$), akrilamid konsantrasyonu ile a^* ve b^* değerleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($P<0,01$) bulunurken, akrilamid konsantrasyonu ile pH, glukoz, toplam indirgen şeker konsantrasyonu ve %protein arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($P<0,05$; $P<0,01$).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler, I.D., Schmid, T.E. and Baumgartner, A.,** 2002. Induction of aneuploidy in male Mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the presented data base. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagens*, 504: 173-182.
- Ahrne, L., Anderssona, C. G., Floberga, P., Rosen, J. and Lingnerta, H.,** 2007. Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. *LWT*, 40: 1708-1715.
- Alpözen, E., Güven, G., Özdestan Ö. ve Üren A.,** 2009. İzmirin 3 Geleneksel Fırın Ürünü. II. Geleneksel Gıdalar Kongresi, Van. Poster Sunumu.
- Amrein, T.M., Andres, L., Schonbachler, B., Conde-Petit, B., Escher, F. and Amad`o, R.,** 2005. Acrylamide in almond products. *Eur. Food Res. Technol.*, 221:14-18.
- Amrein, T. M., Andres, L., Escher, F. and Amado, R.,** 2007. Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*, 24: 13–25
- Arisseto, A.P., Toledo, M. C. F., Govaert, Y., Loco, J. V., Fraselle, S., Degroodt, J. and Caroba, D. C. R.,** 2009. Contribution of selected foods to acrylamide intake by a population of Brazilian adolescents. *Food Science and Technology* 42: 207-211.
- Arribas-Lorenzo, G. and Morales, F.J.,** 2009. Effect of Pyridoxamine on Acrylamide Formation in a Glucose/Asparagine Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 901-909.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bagdonaite, K., Viklund, G., Skog, K. and Murkovic, M.,** 2006. Analysis of 3-aminopropioamide: A potential precursor of acrylamide. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69: 215-221.
- Barutçu, I., Şahin, S. and Sumnu, G.,** 2009. Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *LWT - Food Science and Technology* 42: 17–22.
- Becalski, A., Lau, B.P.-Y., Lewis, D. and Seaman, S.W.** 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 51:802–808.
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A. and Grob, K.,** 2002. Methods for determining the potential formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. *Mill. Geb. Lebensm. Un/ers. Hyg.* 93: 653-667.
- Blank, I.,** 2005. Current Status of Acrylamide Research in Food: Measurement, Safety Assessment and Formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1043: 30-40.
- Calleman, C. J., Bergmark, E., Stern, L. G. and Costa, I. G. A.,** 1993. Nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ. Health Perspect*, 99:221-223.
- Channell, G. A., Wulfert, F. and Taylor, A. J.,** 2008. Identification and Monitoring of Intermediates and Products in the Acrylamide Pathway Using Online Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56:6097–6104.
- Chapin, R. E., Fail, P. A., George, J. D., Grizzle, T.B., Heindel J.J., Harry, G. J., Collins, B.J. and Teague, J.,** 1995. The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27:9-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, F., Yuan, Y., Liu, J., Zhao, G. and Hu, X.,** 2008. Survey of acrylamide levels in Chinese foods. *Food Additives and Contaminants: Part B*. Vol. 1, No. 2, 85-92.
- Curtis Y. T., Powers, S.J., Balagiannis D., Elmore J. S., Mottram D. S., Parry A.J., Rakszeği M., Bedo Z., Shewry P.R. and Halford G.N.,** 2010 . Free Amino Acids and Sugars in Rye Grain: Implications for Acrylamide Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.58:1959-1969
- Costa, L. G.,** 1996. Biomarker research in neurotoxicology; the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ. Health Perspect*, 104:55-67.
- Claeys, W.L., De Vleeschouwer, K. and Hendrickx, M.E.,** 2005a. Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide. *Trends In Food Science & Technology*. 16:181-193.
- Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K. and Hendrickx, M.E.,** 2005b. Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine-Sugar Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 53:9999-10005.
- Claus, A., Carle, R. and Schiebe, A.,** 2008. Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science* 47:118–133.
- Dabrio, M., Sejeroe-Olsen, B., Musser, S., Emteborg, H., Ulberth, F. and Emons, H.,** 2008. Production of a certified reference material for the acrylamide content in toasted bread. *Food Chemistry*, 110:504–511.
- De Vleeschouwer, K., Plancken, I. V., Loey, A. V. and Hendrickx, M. E.,** 2009. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a ultiresponse approach – Part I: Effect of the type of sugar. *Food Chemistry*, 114:116-126.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dybing, E. and Sannner, T.,** 2003. Risk assesment of acrylamide in foods. Toxicological Sciences, 75:7-15 Oxford University Press.
- Eerola, S., Hollebekkers, K., Hallikainen, A. and Peltonen, K.,** 2007. Acrylamide levels in Finnish foodstuffs analysed with liquid chromatography tandem mass spectrometry. Mol. Nutr. Food Res., 51:239-247.
- Foot, R. J., Haase, N. U., Grob, K. and Gonde, P.,** 2007. Acrylamide in fried and roasted potato products: A review on progress in mitigation. Food Additives and Contaminants, 24:37-46.
- Friedman, M.,** (2003). Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review. J. Agric. Food Chem, 51:4504-4526.
- Friedman, M. and Levin, C. L.,** 2008. Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide. J. Agric. Food Chem., 56: 6113–6140.
- Galesa, K., Bren, U., Kranjc, A. and Mavri, J.,** 2008. Carcinogenicity of Acrylamide: A Computational. Study. J. Agric. Food Chem. 56:8720-8727.
- Geng, Z., Jiang, R. and Chen, M.,** 2008. Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography. Journal of Food Composition and Analysis, 21:178-182.
- Gerrard, J. A.,** 2006. The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead—Conference Report from the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction. Trends in Food Science & Technology, 17:324-330.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gertz, C. and Klostermann, S.,** 2002. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J.V. Lipid Sci. Technol.*, 104: 762-771.
- Girma, K. B., Lorenz, V., Blaurock, S. and Edelmann, F. T.,** 2005. Coordination chemistry of acrylamide. *Coordination Chemistry Reviews*, 249:1283-1293.
- Göbel, A. and Kliemant, A.,** 2007. The German minimization concept for acrylamide. *Food Additives and Contaminants*, 24:82-90.
- Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Köksel, H. and Acar, J.,** 2007. Effect of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, 104:1136-1142.
- Gökmen, V. and Palazoğlu, T. K.,** 2008. Acrylamide Formation in Foods during Thermal Processing with a Focus on Frying. *Food Bioprocess Technol*, 1:35-42.
- Gökmen, V. and Palazoğlu, T. K.,** 2009. Measurement of evaporated acrylamide during frying of potatoes: Effect of frying conditions and surface area-to-volume ratio. *Journal of Food Engineering*, 93:172-176.
- Granby, K. and Fagt, S.,** 2004. Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee. *Analytica Chimica Acta* 520:177-182.
- Granda, E., C.,** 2005. Kinetics of Acrylamide Formation in Potato Chips. Master Thesis, Texas A&M University, Biological and Agricultural Engineering, 171p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Granvogel, M. and Schieberle, P.,** 2006. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16): 5933-5938.
- Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T. and Stadler, R. H.,** 2007. Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants*, 24:60-70.
- Hasegawa, K., Miwa, S., Tajima, T., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H. and Miwa, J.,** 2007. A rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide, a harmful substance in food. *Toxicology Letters*, 175:82-88.
- He, F.S., Zhang, S.L., Wang, H.L., Li, G., Zhang, Z. M., Li, F.L., Dong, X.M. and Hu, F.,** 1989. Neurological and electroneuromyographic assesment of the adverse effects of acrylamide on occupational exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health* 15:125-129.
- Hidalgo, F. J., Delgado, R. M. and Zamora, R.,** 2009. Degradation of asparagine to acrylamide by carbonyl-amine reactions initiated by alkadienals. *Food Chemistry*, 116:779-784.
- Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W. and Hartig, L.** 2004. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520:207-215.
- IARC,** (1994). Acrylamide. In some industrial/chemicals; IARC monographs on the evaluation of careinogenic risks to humans; International Agency for research on cancer: Lyon, France, 60:389-433.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jung, M., Choi, D., & Ju, J.** 2003. A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *Food Chemistry and Toxicology*, 68:1287-1290.
- Kim, C. T., Hwang, E. S. and Lee, H. J.,** 2007. An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. *Food Chemistry*, 101:401-409.
- Knol, J. J., Viklund, G. A. I., Linssen, J. P. H., Sjöholm, I. M., Skog, K. I. and Boekel, M. A. J. S.,** 2009 .Kinetic modelling: A tool to predict the formation of acrylamide in potato crisps. *Food Chemistry*, 113:103-109.
- Leung, K. S., Lin, A., Tsang, C. K. and Yeung, S. T. K.,** 2003. Acrylamide in Asian foods in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants*, 20(12): 1105-1113.
- Lingnert, H., Grivas, S., Jagerstad, M., Slog, K., Törnqvist, M. and Aman, P.** 2002. Acrylamide in food mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scand. J. Nutr.*, 46:159-172.
- Locas, C. P. and Yaylayan, V. A.,** 2008. Further Insight into Thermally and pH-Induced Generation of Acrylamide from Glucose/Asparagine Model Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 56:6069-6074.
- Mestagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Peteghem, C. V. and Meulenaer, B. D.,** 2008. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*, 107:26-31.
- Morales, F. J. and Arribas-Lorenza, G.,** 2008. The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions. *Food Chemistry*, 109:421-425.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mottram, D. S. and Friedman, M.,** 2008. Symposium on the Chemistry and Toxicology of Acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 56:5983.
- Mucci, L., Dickman, P., Steineck, G., Adami, H. and Augustsson, K.,** 2003. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden, *British Journal of Cancer.* 88:84-89.
- Ölmez,H., Tuncay, F.,Özcan, N. and Demirel, S.** 2008. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *Journal of Food Composition and Analysis,* 21:564-568.
- Ötleş, S. and Ötleş, S.,** 2004a. Acrylamide in Food (Chemical Structure of Acrylamide). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.* 3 (5):723-730.
- Ötleş, S. and Ötleş, S.,** 2004b. Acrylamide in food (Formation of acrylamide and its damages to health). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities.* 7 (2),.
- Quayson, E. T. and Ayernor, G. S.,** 2007. Non-enzymatic browning and estimated acrylamide in roots, tubers and plantain products. *Food Chemistry,* 105:525-1529.
- Palazoğlu, T. K. and Gökmen, V.,** 2010. Effect of cooking method on Acrylamide Level of Potatoe Chips. *Journal of Food Science and Physical Properties ,* 75:25-29.
- Pedreschi, F., Kaack, K. and Granby, K.,** 2006. Acrylamide content and color development in fried potato strips. *Food Research International,* 39:40-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pedreschi, F., Kaack, K. and Granby, K.,** 2008. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry* 109:386–392.
- Pelucci, C., Francheschi, S., Levi, F., Tricholopoulos, D. and Bosetti, C.,** 2003. Fried Potatoes and Human Cancer. *Int. J. Cancer*: 105:558-560.
- Pittet, A., Perisset, A. and Oberson, J.,** 2004. Trace level determination of acrylamide cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035:123-130.
- Ren, Y., Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z. and Zhang, Y.,** 2006. Isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 23(3):228-236.
- Rice, J. M.,** 2005. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research*, 580:3-20.
- Sakamoto, J. and Hashimoto, K.,** 1986. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice-effects on fertility and sperm morphology. *Arch. Toxicol.* 59:201-205.
- Santis, N., Mendozai F., Moyanoa, P., Pedreschi, F. and Dejmek, P.,** 2007. Soaking in a NaCl solution produce paler potato chips. *LWT* 40:307-312.
- Shaikh, M.B., Tarade, K.M., Bharadwaj, V.R., Annapure, U.S. and Singhal, R.S.,** 2009. Effect of an alkaline salt (papad khar) and its substitute (2:1 sodium carbonate:sodium bicarbonate) on acrylamide formation in papads. *Food Chemistry*, 113:1165-1168.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shelby, M. D., Cain, K. T., Cornett, C.V. and Generoso, W. M., 1987.**
Acrylamide: Induction of heritable translocations in mal emice. *Environ. Mutagen.* 9:363-368.
- Surdyk, N., Rosen, J., Andersson, R. and Aman, P. (2004).** Effects of asparagine, fructose and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J. Agric. Food Chem.* 52:2047-2051.
- Sıklı, Ö.H., 2003.** “Nohut Mayasının Mikrobiyolojik ve Lezzet Karakteristiklerinin Araştırılması”. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi. s. 39-41, 70-71 İzmir
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas, K., Lind, Y. And Rosen, J., 2003.** Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, 41:1581-1586.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Starller, R.H., Gonde, P., Van Eijck, P., Laljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Muler, D., Tlimadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvani, D. and Whitnore, T., 2004.** A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation and control. *Cri./Rev. Food Sci. Nu.*,44:323-347.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson S. and Törnqvist, M. 2002.** Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4998-5006.
- Tritscher, A., 2004.** Human health risk assesmentof processing-related compounds in food. *Toxicology Letters*, 149:177-186.
- Vattem, D.A. and Shetty, K., 2003.** Acrylamide in food: a model for mechanism and its reduction. *Innoulions Food Sci. Emerging Techno.*, 4:331-338.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Viklund , G.A., Olsson, K.M., Sjöholm I.M. and Skog, K.I.,** 2010. Acrylamide in crisps: Effect of blanching studied on long-term stored potato clones. *Journal of Food Composition and Analysis.* 23:194-198
- Vinci , R.M., Mestdagha F., Muer N., Peteghem C.V. and Meulenaer B.,** 2010. Effective quality control of incoming potatoes as an acrylamide mitigation strategy for the French fries industry. *Food Additive and Contaminants.* 27:417-425
- Wicklund, T., Ostliea, H., Lothe, O., Knutsen, S. H., Brathen, E. and Kita, A.,** 2006. Acrylamide in potato crisp—the effect of raw material and processing. *LWT,* 39:571-575.
- Wise, L. D., Gordon, L. R., Soper, K. A., Duchai, D. M. and Morissey, R. E.,** 1995. Developmenal neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprauge-Dawley rats. *Nuerotoxicol. Teratol.,* 17:189-198.
- Wilde, T.,D., Meulenaer, B.D., Mestdagh, F., Govaert, Y., Vandeburie, S., Ooghe, W., Fraselle, S., Demeulemeester, K., Peteghem, C.V., Claus, A., Degroodt, J.M. and Verhe, R.,** 2005. Influence of Storage Practices on Acrylamide Formation During Potato Frying. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* 53:6550-6557.
- Wenzl, T., Beatriz de la Calle, M. and Anklam, E.,** 2003. Analytical methods fort he determination of acrylamide in food products; a review. *Food Additives and Contaminants,* Vol 20(10):885-902.
- Yaylayan, V., Wnorowski, A. and Locas, C.,** 2003. Why asparagin needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.,* 51:1753-1757.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yuan, Y., Zhao, G., Chen, F., Liu, J., Wua, J. and Hu, X.,** 2008. Correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in fructose/asparagine Maillard reaction model system. *Food Chemistry*, 108:885-890.
- Zhou, X., Fan, L. Y., Zhang, W. and Cao, C. X.,** 2007. Separation and determination of acrylamide in potato chips by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Talanta*, 71:1541-1545.
- Zou, Y., Li, G., Duan, Y., Chen, S., Zhang, C. and Li, Y.,** (2008). Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. *Food Chemistry*, 109:899-908.
- Zhang, Y., Zhang, G. and Zhang, Y.,** 2005. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075:1–21.
- Zhang, Y., Dong, Y. and Ren, Y.,** 2006. Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture dedector. *Journal of Chromatography A*, 1116:209-216.
- Zhang, Y. and Zhang, Y.,** 2007. Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on the Current State of Knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 521–542.
- Zyzak, D., Sanders, R., Stokanovic, M., Tallmadge, D., Eberhart, B., Ewald, D., et al.,** 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:4782-4787.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kırcaali-Bulgaristan'da doğmuş; ilk, orta ve lise eğitimini İzmir'de tamamlamıştır. 1999-2003 yılları arasında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans öğrenimini tamamlamıştır. 2002 yılında stajını IAESTE aracılığıyla burslu olarak Queen's University Belfast' da tamamlamıştır. 2004- 2005 yılları arası Figsan Dış Ticaret Ltd. Şti' de çalışmış, 2005 yılında KPSS ile Tarım Bakanlığı Kütahya İl Tarım Müdürlüğü' ne atanmış, 2007 'de İzmir İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü' ne tayin olmuş ve halen bu kurumda çalışmaya devam etmektedir. 2008 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.