T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji
Anabilim Dalı

İMMUNO-ENZİMATİK YÖNTEMLE TİCARİ KÖPEK VE KEDİ MAMALARINDA AKRİLAMİD BELİRLENMESİ

Hazırlayan
NİMET KILIÇ

Danışman
Prof.Dr. BİLAL CEM LİMAN

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2015
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji
Anabilim Dalı

İMMUNO-ENZİMATİK YÖNTEMLE TİCARİ KÖPEK VE KEDİ MAMALARINDA AKRİLAMİD BELİRLENMESİ

Hazırlayan
NİMET KILIÇ

Danışman
Prof.Dr. BİLAL CEM LİMAN

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2014-4950 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2015
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Nimet KILIÇ

İmza:

"İmmuno-enzimatik Yöntemle Ticari Köpek ve Kedi Mamalarında Akrilamid Belirlenmesi" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Nimet KILIÇ

Danışman

Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN danışmanlığında Nimet KILIÇ tarafından hazırlanan **"İmmuno-enzimatik Yöntemle Ticari Köpek ve Kedi Mamalarında Akrilamid Belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

31 /08 / 2015

JÜRİ: **İMZA**

Danışman : Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN (Vet. Farmakoloji-Toksikoloji A.B.D.)

Üye : Prof.Dr. Murat KANBUR (Vet. Farmakoloji-Toksikoloji A.B.D.)

Üye : Doç.Dr.Ebru YILDIRIM (Vet. Farmakoloji-Toksikoloji A.B.D.) E.Yıldırım

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım ve hocam Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bilal Cem Liman'a, ayrıca Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Murat Kanbur ve Sayın Prof. Dr. Gökhan Eraslan'a, tezin deneysel çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. M. Yasin Tekeli'ye teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamdaki değerli bilimsel katkıları, çalışmalarım süresince gösterdiği ilgi, sabır ve anlayıştan dolayı sevgili eşim Prof. Dr. Nuh Kılıç'a, hayatıma anlam ve inanılmaz mutluluk katan canım kızım Buse Kılıç'a, çalışmam boyunca bana sağladığı motivasyon ve destek nedeniyle canım arkadaşım Öğr. Gör. H. Nurcan Ek'e, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, eğitim hayatım boyunca ellerinden gelen her türlü desteği sağlayan anneme, babama ve ailemin tüm fertlerine tüm içtenliğimle sonsuz teşekkür ederim.

Nimet KILIÇ

Ağustos 2015

İMMUNO-ENZİMATİK YÖNTEMLE TİCARİ KÖPEK VE KEDİ MAMALARINDA AKRİLAMİD BELİRLENMESİ

Nimet KILIÇ
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2015
Danışman: Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

ÖZET

Günümüzde insan himayesinde yetiştirilen pet hayvanlarının gıdalarını pek de seçebilme şansı yoktur. Bu yüzden insanın kedi ve köpek besleme konusunda yapacağı hatalar hayvanın sağlığını olumsuz yönde etkileyecektir. Kedi köpek mamasının üretimi esnasında çeşitli aşamalarda yüksek ısı uygulamaları mevcuttur. Kedi, köpek mamasının yapısında nişasta ihtiva etmesi sebebiyle olası Maillard reaksiyonu sonucu akrilamid oluşabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmanın amacı piyasada mevcut farklı firmalara ait kuru kedi ve köpek yeminde akrilamid kalıntısını immuno-enzimatik olarak belirlemektir. Böylece kedi ve köpek sağlığı için varsa olası tehdit tespit edilecek, ayrıca bu yöntemle ilk defa mamalarda akrilamid düzeyi belirlenerek yöntemin uygulanabilirliği test edilecektir.

Bu amaçla piyasada çeşitli firmalara ait 42 adet kedi ve köpek maması rastgele toplanmış ve çeşitli aşamalardan geçirilerek teste hazır hale getirilmiştir. Immunoenzimatik yolla gıdalardaki akrilamid kalıntısı test edilmiş ve sonuç olarak kuru kedi ve köpek mamalarında analiz edilen örneklerin yaklaşık % 33'ünde (14 örnek) *akrilamid* varlığına rastlanmıştır, bu örneklerde ortalama *akrilamid* yoğunluğu 87.35 ppb dir. Bulgulara göre en yüksek *akrilamid* yoğunluğu 155 ppb, en düşük yoğunluk ise 45 ppb olup, toplam örnek sayısının (n) % 67'sinde ise *akrilamid* tespit edilememiştir.

Sonuç olarak, immunoenzimatik metodun kedi ve köpek mamalarında standart bir teknik olarak kullanılabilmesi için bundan sonra daha geniş çaplı araştırmalar tarafından

desteklenmesi gerekmektedir. Yine koruyucu olarak gıdalarını seçme şansı bulunmayan pet hayvanlarının yemlerinin hazırlanması esnasında akrilamid oluşumuna neden olan Maillard reaksiyonunu sınırlandırmak için formülasyonun ve proses parametrelerinin değiştirilmesi, özellikle Ekstrüzyon ve diğer ısı gerektiren işlemlerin özenle yapılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Kedi, köpek, kuru mama, akrilamid, immuno-enzimatik yöntem

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE USING IMMUNO-ENZYMATIC METHOD IN COMMERCIAL DOG AND CAT FOOD

Nimet KILIÇ
Erciyes University Institute of Health Sciences,
Department of Veterinary Pharmacology & Toxicology
Master Thesis, August 2015
Supervisor: Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

ABSTRACT

Nowadays the pets which are grown in human auspices have no chance to choose their food. So mistakes that people make about food of their cats and dogs will adversely affect the health of animals in a negative way. During the production of cat and dog food, high temperature applications at different stages are available. As result of the starch containing structure of the cat and dog food, it is foreseen that acrylamides may be present in the food because of Maillard reaction. The aim of this study is to detect acrylamides in dry cat and dog food which are currently available in the market with a new method which is immunoenzymatic method. In this way potential health risks for cats and dogs will be detected, for the first time using this method acrylamides levels will be detected and applicability of this method is going to be tested.

For this purpose, from a variety of firms in the market 42 cat and dog food were randomly collected and passed through several stages for testing. Residual acrylamide in food was tested using immunoenzymatic method and as a result analyzed dry cat and dog food samples, 33% (14 samples) presence of acrylamide have been found, in these samples average acrylamide density is 87.35 ppb. According to the findings the highest acrylamide density is 155 ppb and the lowest is 45 ppb, in 67% of total samples acrylamide was not detected.

Consequently, ımmunoenzymatic method can be used as a standart technique on cat and dog food but it must be supported by a wider range of research. Again it can be advised that while preparing food for pets without the chance of food selection formulation changes, process paremeter changes and specially extrusion and other heat related stages can be done more carefuly to limit Maillard reaction which causes acrylamide in food.

Key words: Cat, dog, dry feed, acrylamide, ımmuno-enzymatic method

İÇİNDEKİLER

İMMUNO-ENZİMATİK YÖNTEMLE TİCARİ KÖPEK VE KEDİ MAMALARINDA AKRİLAMİD BELİRLENMESİ

Sayfa

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER x
KISALTMALAR xiii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. Akrilamid nedir? 3
2.2. Akrilamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 4
2.3. Gıdalarda Akrilamid Oluşum Mekanizması 6
2.4. Akrilamid Oluşumuna Etki Eden Faktörler 11
2.4.1. İndirgen Şekerler 11
2.4.2. Aminoasitler 11
2.4.3. Ph Değerinin Etkisi 12
2.4.4. Nem ve Su Aktivitesinin Etkisi 12
2.4.5. Isıl İşlemin Etkisi 13
2.4.6. Depolama koşulları 13

2.5. Farmakokinetik Özellikler 14
2.5.1. Absorbsiyon 14
2.5.2. Dağılım ve Bağlanma 14
2.5.3. Metabolizma 14
2.5.4. Eliminasyon 15
2.6. Çeşitli Gıdalardaki Akrilamid Miktarları 15
2.7. Akrilamidin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri 17
2.8. Akrilamidin Günlük Alım Seviyesi ve Yasal Uygulamalar 19
2.9. Akrilamid Analiz Yöntemleri 21
2.10. Köpek ve Kedi yemleri 25
2.10.1. Köpek ve Kediler İçin Yem Üretimi Ve Formları 29
2.11. Pet Hayvanlarında Yemlerin Hazırlanma Aşamaları ve Yem Teknolojisi 31
2.11.1. Mekanik İşlemler 31
2.11.1.1. Kabuğun alınması (Dehulling) 31
2.11.1.2. Kırpma (Clipping) 31
2.11.1.3. Öğütme (Grinding) 31
2.11.1.4. Ezme (Rolling) 32
2.11.1.5. Buharlı sıkıştırma (Ekstrüzyon) 32
2.11.2. Isı Uygulamaları 33
2.11.2.1. Kuru ısıtma yöntemi 33
2.11.2.2. Nemli ısıtma yöntemi 34
2.11.2.3. Pulcuk haline getirme (Plaking) 34
2.11.2.4. Peletleme (Pelleting) 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. Kullanılan Cihaz, Gereç ve Kimyasallar 35
3.1.1. Cihaz ve Gereçler 35
3.1.2. Kimyasallar 36
3.2. Yöntem 37
3.2.1. Pet Yem Numunelerinin Toplanması ve Deneye Hazırlanması 37
3.2.2. EIA Analiz Yöntemi 38
3.2.3.Değerlendirme 39
3.2.4. İstatistik Analiz 40

4. BULGULAR 41
4.1. Akrilamid EIA Analiz Bulguları.....41
4.1.1. Linearity (Doğrusallık) 41
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....44
6. KAYNAKLAR 50
ÖZGEÇMİŞ.....59

KISALTMALAR

AA	: Akrilamid
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
EC	: Avrupa Komisyonu
USEPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Dairesi
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EIA	: Enzyme Immuno Assay
CYP450 2E1	: Sitokrom P450 2E1
LTS	: Düşük sıcaklıkta şekerlenme
SML	: Spesifik Migrasyon Limiti
ppm	: Milyonda kısım
ppb	: Milyarda Kısım

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Farklı çözücülerde akrilamidin çözünürlüğü	5
Tablo 2.2.	Farklı ülkelerde üretilen çeşitli gıdaların akrilamid miktarları	16
Tablo 2.3.	Çeşitli gıdalara ait FDA akrilamid verileri	17
Tablo 2.4.	Avrupa Birliğinde akrilamide ait izin verilen üst sınırlar	20
Tablo 2.5.	Gıdalarda akrilamid için gösterge değerleri	21
Tablo 2.6.	Avrupa Birliği üyesi ülkelerde akrilamid analizi için kullanılan yöntemler	22
Tablo 2.7.	Kedi ve Köpek yiyeceklerinde bulunması gereken besin maddeleri (%)	26
Tablo 2.8.	Köpek ve kedilerin karbonhidrat toleransları	28
Tablo 3.1.	Ticari EIA (ABRAXİS) kiti için verilen optimum deney değerleri	39
Tablo 3.2.	Kullanılan akrilamid standartları	39
Tablo 4.1.	Pet yem örneklerindeki EIA yöntemine göre akrilamid (AKR, **ppb**) düzeyleri	42
Tablo 4.2.	Akrilamid tespit edilen pet yem örneklerinin bulunan değerlere göre dağılım aralıkları (ppb)	43
Tablo 4.3.	Pet yem örneklerinde akrilamid düzeylerine ait aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Akrilamidin molekül yapısı	4
Şekil 2.2.	Glisidamidin molekül yapısı	6
Şekil 2.3.	Maillard Reaksiyonu Üzerinden Akrilamid Oluşumu	8
Şekil 2.4.	Akrilamid, renk ve flavor bileşiklerinin Maillard reaksiyonuyla üretiminin şematik gösterimi	9
Şekil 2.5.	Akrilik asit, asparajin ve akrolein üzerinden akrilamid oluşumu	10
Şekil 4.1.	Akrilamid Standart eğrisi.	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akrilamid monomer yapısında olup başta poliakrilamid üretimi olmak üzere çeşitli endüstri alanlarında sık olarak kullanılmaktadır. Nişasta bakımından zengin gıdalara yüksek ısıl işlem uygulandığında değişik konsantrasyonda doğal olarak da ortaya çıkmaktadır. Akrilamid oluşumunda ana yol Maillard reaksiyonu olarak bilinen, amino asit ve karbonil grubu arasında meydana gelen şeker indirgenmesidir. Akrilamid hayvanlar ve insanlar tarafından sindirim, solunum veya deri yoluyla alınabilir. Alındığı yola bakmaksızın akrilamid tüm dokulara hızla yayılır. Timus, karaciğer, kalp, beyin, böbrekler, plasenta ve anne sütünde tespit edilmiştir. Sitokrom P450'nin oksidasyonu ile glisidamid'e metabolize olur. Akrilamid ve glisidamid in vivo ortamda, hemoglobin, serum albuminleri, DNA ve enzimlere bağlanabilir. Akrilamid insanları ve hayvanları etkiler. Tipik bulgular arasında ataksi ve iskelet kaslarında zayıflık yer alır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) akrilamidi olası kanserojen 2A grubuna dahil etmiştir. Akrilamidin fare ve ratlarda kansere neden olduğu doğrulanmıştır. Çeşitli biyolojik araştırmada genetik ve reprodüktif toksisitesi bulunduğu kanıtlanmıştır.

Gıdalarda bulunan akrilamid tespiti ile ilgili analitik metotlar mevcuttur. Akrilamid tayininde gaz kromatografi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve kapillar elektroforez (CE) tekniğinin kullanılmasının yanısıra immuno-enzimatik yöntemler de sıkça kullanılmaktadır. Enzim yardımıyla analiz yapmanın faydaları; hızlı ve kısa süreli, düşük maliyetli, seçici olması ve basit bir sistem gerektirmesidir.

Karbonhidratça zengin yüksek ısıya maruz kalmış yemler sadece çiftlik hayvanlarının yemlerinde değil aynı zamanda pet hayvanlarının mamalarının hazırlanması esnasında da kullanılmaktadır. Zira kedi ve köpek mamalarının içeriğinde patates ve tahıllar vardır ve bunlar yüksek sıcaklıkta hazırlanmaktadır. Tam da bu durum Maillard reaksiyonu

için mükemmel koşullar oluşturur. Pet hayvan mamalarında akrilamid varlığı ve olası etkileri bilinmemektedir.

Bu çalışma, kuru kedi ve köpek mamalarında olası akrilamid kalıntılarının immunoenzimatik yöntem ile belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akrilamid Nedir?

Akrilamid ilk kez 1893 yılında Alman bilim adamı Charles Moureu tarafından, akrilil klorürün benzendeki doygun çözeltisine amonyak eklenmesi yoluyla sentezlenmiştir (1). 1930'lu yıllara kadar kullanımı sınırlı olan akrilamidin önemi, tekstil ve yapay kauçuk üretiminde akrilik fiberlerin kullanımının yaygınlaşmasıyla artmıştır. 1954 yılında American Cyanide firması tarafından ticari akrilamid üretimi ile endüstriyel tüketim artmış, akrilamidin polimerleşmesi ve sentezi üzerine yeni yöntemler geliştirilmiştir (2,3).

Akrilamid günlük yaşantımızda kullandığımız birçok ürünün içinde farklı şekilde yer alan, monomerik ve polimerik olmak üzere iki formu bulunan, çok yönlü organik bir bileşiktir. Monomer halindeki akrilamidin sinir sistemi için toksik etkisi bulunmakta olup, laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar sonucunda, hayvanlar için kanserojen etkisinin de bulunduğu ve insanlar için de kanserojen bir madde olabileceği bildirilmiştir. Akrilamidin monomerik formu, polimerik formuna göre daha zararlı olmasına rağmen, poliakrilamidin de gıdalara dışarıdan bulaşması halinde zararlı etkilerinin olduğu belirtilmektedir (4).

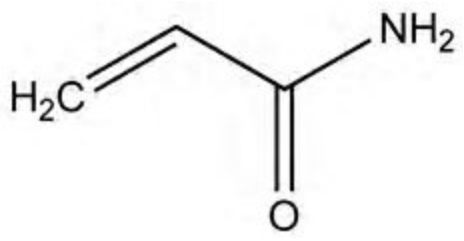
Günümüzde akrilamid, akrilonitrilin bakır katalizi veya sülfürik asit ile hidrolizi yoluyla veya enzimatik yollarla elde edilmektedir. Akrilamid en çok poliakrilamid ve türevlerinin üretilmesinde kullanılmaktadır. Bu türevler ise büyük oranda içme suyu, atık su, kağıt, maden ve petrol işlemede kullanılmaktadır. Gıda ve sulardaki önemi ise 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Dairesi (NFA) ve Stokholm Üniversitesi'nden bilim adamlarınca açıklanmıştır. İsveçli bilim adamlarının açıklamasının ardından yapılan

çalışmalarda, kızartılmış, fırınlanmış ve kavrulmuş gıda maddelerinin hemen tamamında birkaç ppb seviyesinden birkaç ppm seviyesine kadar değişen miktarlarda akrilamid tespit edilmiştir. Bu durum, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği başta olmak üzere tüm dünyada büyük ilgiyle karşılanmış ve konu "ciddi problem" olarak ele alınmıştır. Bunun başlıca sebebi, akrilamidin kemirgenler için kanıtlanmış kanserojen ve insanlar için kanıtlanmış nörotoksin etkisiyle IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi) tarafından akrilamidin "insan için olası kanserojen" olarak sınıflandırılmış (grup 2A) olmasıdır (5).

2.2 Akrilamidin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri

Akrilamid (2-propenamid, CAS No. 79-06-1)

Etilen karboksamid, akrilik asit amid, vinil amid, propenoik asit amit olarak da bilinmektedir ve CH_2-$CHCONH_2$ molekül formülüne sahiptir.



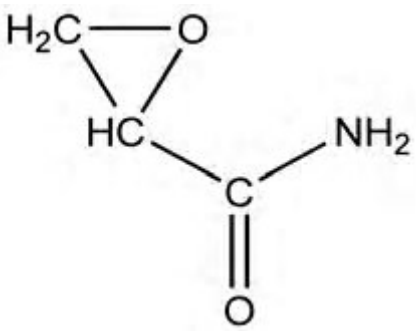
Şekil 2.1. Akrilamidin molekül yapısı

Molekül yapısı Şekil 2.1.'deki gibi Akrilamid, molekül ağırlığı 71,08 olan, oda sıcaklığında beyaz, kristal formda bir maddedir (6,7). Akrilamidin erime sıcaklığı 84,5±0,3 ^{0}C, kaynama sıcaklığı; 125 ^{0}C (3,3 kPa /25 mm Hg'de) (7), atmosfer basıncında 192,6 ^{0}C'dir (8). Akrilamid, erime noktasına ulaştığında ya da ultraviyole ışığa maruz bırakıldığında hemen sürekli polimerleşmeye başlar (9). Reaktif elektrofilik çift bağ ve amid grubu içeren akrilamid (Şekil 2.1.) hem zayıf asidik hem de bazik özellik göstermektedir. Su içerisinde oldukça iyi çözünen akrilamid metanol, etanol ve aseton gibi polar organik çözücülerde iyi çözünürken; hekzan ve heptan gibi polar olmayan çözücülerde (Tablo 2.1.) çok az miktarda çözünmektedir (7).

Tablo 2.1. Farklı çözücülerde akrilamidin çözünürlüğü (7).

ÇÖZÜCÜ	g\100 mL, 30 ^{0}C
Su	215,5
Metanol	155
Dimetil sulfoksit	124
Dimetil formamid	119
Etanol	86,20
Aseton	63,10
Pridin	61,90
Asetonitril	39,60
Kloroform	2,66
1,2-Dikloroetan	1,50
Benzen	0,35
Karbon tetraklorid	0,038
n-Heptan	0,0068

Akrilamid iki farklı fonksiyonel gruba sahip monomerik bir yapıdır. Elektronca zayıf bir çifte bağ ile bir amid grubuna sahiptir ve kimyasal reaksiyonlara bu gruplar aracılığıyla katılmaktadır. Akrilamid, sahip olduğu çifte bağ ile amonyak, aminler, alkoller gibi nükleofilik maddelerle Michael tipi katılma reaksiyonları verirken, Diels – Alder reaksiyonlarına ve serbest radikallerle çeşitli reaksiyonlara da girer. Amid grubu ise hidroliz, dehidrasyon ve aldehitlerle kondenzasyon reaksiyonları verebilmektedir. Polimerleşmesi, sodyum persülfat ve sodyum bisülfit gibi serbest radikal kaynakları kullanılarak başlatılmakta, reaksiyon şartlarına bağlı olarak doğrusal veya çapraz bağlı polimerler elde edilebilmektedir. Erime noktasının üzerindeki sıcaklıklarda veya UV ışık altında da kolayca polimerleşebilmektedir. Bu reaksiyonlarının yanı sıra akrilamid, vücutta metabolizasyonu esnasında CYP2E1 (P450) enzimi aracılığıyla bir epoksit türevi olan glisidamide dönüşmektedir. Glisidamid, akrilamidin zararlarının değerlendirilmesi açısından anahtar bir role sahiptir; çünkü akrilamid, toksik etkilerinin büyük bir kısmını bu madde aracılığıyla göstermektedir (10). Glisidamid molekülünün yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Glisidamidin molekül yapısı

2.3. Gıdalarda Akrilamid Oluşum Mekanizması

Isıl işlem gören gıdalarda akrilamid oluşumuyla ilgili pek çok teori öne sürülmüştür. Birincisi, lipidlerin transformasyonu veya aminoasitlerin, proteinlerin ve karbonhidratların degredasyonu sonucu oluşan akrolein (2-propanal) üzerinden akrilamid oluşumunu kabul eden teoridir (11,12). Diğer bir teoriye göre ise, akrilamid gıdada bulunan azot içeren bileşiklerin yeniden yapılanması sonucu, akrolein olmadan direk oluşmaktadır (12,13). Genel olarak kabul edilen teori, akrilamidin Maillard reaksiyonu sonucu oluştuğunu kabul eden teoridir. Yapılan çalışmalarda asparajinin akrilamid oluşumundan sorumlu major aminoasit olduğu tespit edilmiştir (14).

Maillard reaksiyonu ekmek kabuğunda renk ve aroma teşkilinde önemli bir yere sahipken akrilamid gibi toksik bileşenlerin oluşumuna da neden olabilmektedir (14,15). Akrilamid, 120 ^{0}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda asparajinle indirgen şekerler arasında meydana gelen ve maillard reaksiyonu olarak bilinen esmerleşme reaksiyonu sonucu oluşmaktadır (14,16). Asparajin, patates ve tahıllarda aminoasit ve indirgen şekerler arasındaki maillard reaksiyonu üzerinden akrilamid oluşturması nedeniyle esas amino asit olarak bilinmektedir. Asparajin üzerinden akrilamid teşkili, patates ve tahıl gibi bitkisel kaynaklı ürünlerin yapılarında bu aminoasidi yüksek oranda içermeleri ile açıklanabilir. Asparajin, dekarboksilasyon ve deaminasyon ile akrilamide dönüşebilir, ancak asparajinin akrilamide dönüşümünde esas gerekli olan madde karbonhidratlardır (17).

Bazı karbonil kaynaklarının maillard reaksiyonu arttıracağı görülmüştür. Bunlar fruktoz ve glikoz gibi α-hidroksi karbonil bileşenleri olup aktivasyon enerjisi üzerindeki düşük etkilerinden dolayı diğer bileşenlere kıyasla daha etkilidirler (17,18). Bunun yanında glioksal gibi şeker yıkım ürünleri de maillard reaksiyonuna neden olmaktadır (19).

Yapılan çalışmalarda pişmiş gıdalarda indirgen şeker ve karbonil kaynaklarından sonra aminoasit, asparajin ve amidlerin de akrilamid oluşumunda önemli yere sahip olduğu görülmüştür. Dekarboksile olmuş asparajinin (3-aminopropionamide) ısıtma uygulandığında indirgen şeker yokluğunda akrilamid oluşturma kabiliyetine sahip olduğu tespit edilmiştir (15).

Akrilamid oluşumuna neden olan Maillard reaksiyondaki temel katılımcılar patates ve tahıl ürünlerindeki en önemli aminoasit olan asparajin, fruktoz ve glukoz indirgen şekerleridir (13).

Maillard reaksiyonu üç ana basamaktan oluşur;

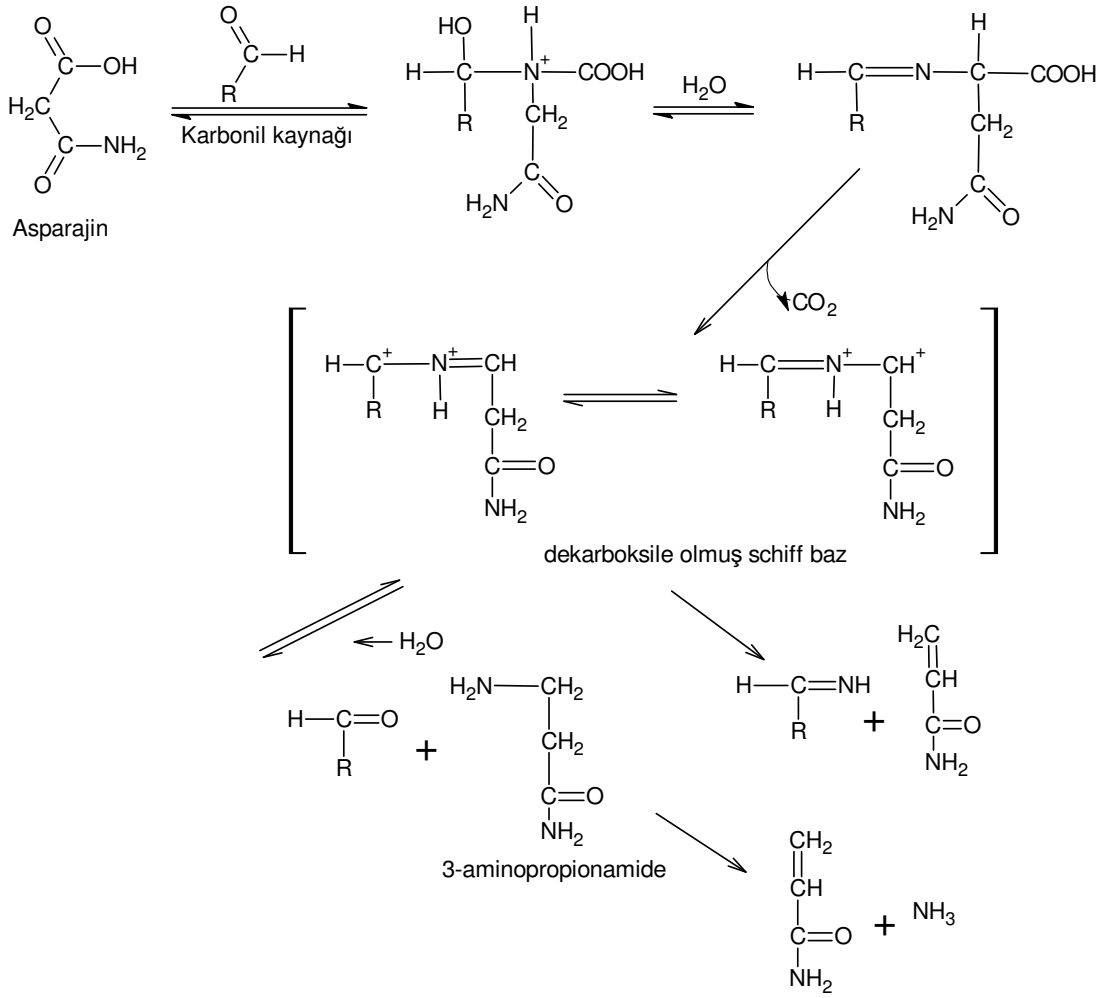
1) Serbest amino grubunun ve indirgen sekerlerin Amodori ya da Heynes yeniden yapılanma ürünlerine kondensasyonu,

2) Amodori yeniden yapılanma ürünlerinin farklı yollarla (deoksiosonez, fragmantasyon, Strecker degradasyonu) degradasyonu,

3) Polimerizasyon (kahverengi azotlu polimerlerin ve co-polimerlerin oluşumu) (8).

Akrilamidin maillard reaksiyonu ile oluşumunda ilk basamak, Schiff baz teşkili olup, bu oluşum Amadori ürünlerinin dekarboksilasyonuna alternatif düşük enerji sağlamaktadır. Oluşan Schiff baz parçalanarak 3-aminopropionamide hidrolize olarak buradan akrilamid oluşumu meydana gelmekte ya da Schiff bazdan aradaki 1-2 oluşum elimine edilerek doğrudan akrilamid oluşmaktadır (20).

Maillard reaksiyonunda meydana gelen Schiff bazın erken dekarboksilasyonu, Amadori ürünü oluşumuna ve β eliminasyonu sonucu akrilamid oluşumuna neden olmaktadır (17). Maillard reaksiyonu ile akrilamid oluşumu Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Maillard Reaksiyonu Üzerinden Akrilamid Oluşumu (15).

Maillard reaksiyonunda ikinci basamak Amodori yeniden yapılanma ürünlerinin farklı yollarla oluşumudur. Fragmantasyonla Amodori ürünleri 1- ve 3- deoksidikarbonil (deoksiosonez) bileşiklerini oluşturan degradasyona uğrar (8).

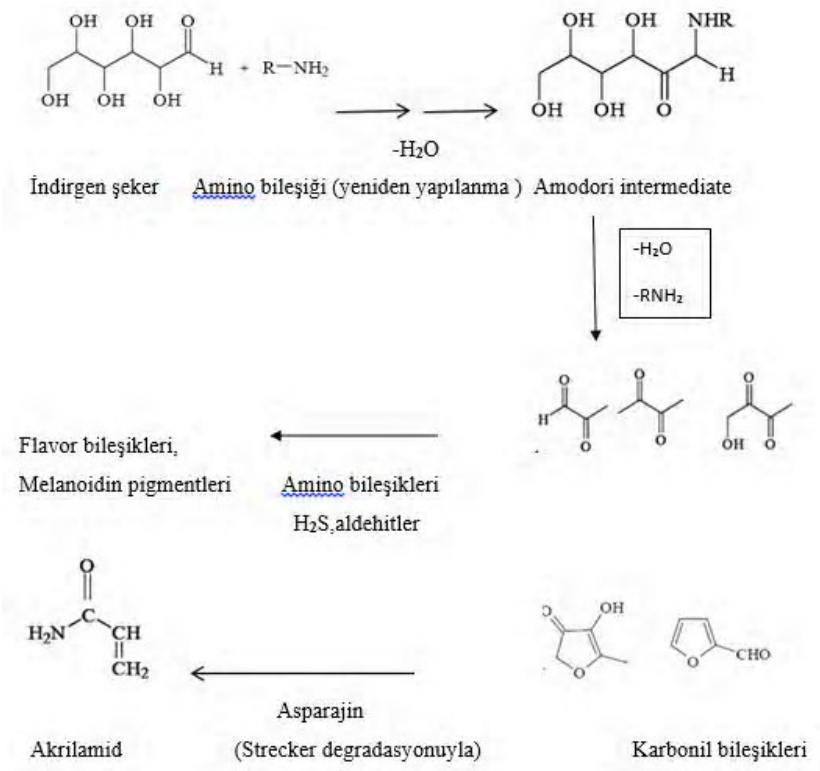
İndirgen sekerler ve serbest aminoasitler Maillard reaksiyonunda flavor bileşiklerinin ve esmerleşmenin de nedenidir. Üründe akrilamid de bu sırada oluşmaktadır (19). Maillard reaksiyonunda flavor ve aromanın da oluştuğu en önemli reaksiyonlardan biri Strecker degradasyonudur. Strecker degradasyonu amino asitlerle alfa-dikarbonillerin (deoksiosonesler) reaksiyondur. Strecker degradasyonu sırasında amino asitlerin dekarboksilasyonu ve deaminasyonu sonucunda aldehitler (formaldehit, asetaldehit,

belki de propenaldehit (akrolein) oluşur (8). Maillard reaksiyonunda akrilamid, renk ve tat maddelerinin oluşumunun şematik gösterimi Şekil 2.4'de verilmiştir (17,18).

Maillard reaksiyonundaki üçüncü basamak ise polimerizasyondur. Bu basamaktaki reaksiyonlar renk gelişimi için önemlidir çünkü bu basamakta kahverengi azotlu polimerler ve co-polimerler oluşmaktadır. Oluşan renk bileşikleri iki genel sınıfa ayrılabilir;

1) Düşük molekül ağırlıklı bileşikler,

2) Molekül ağırlığı fazla olan melanoidinler (8).

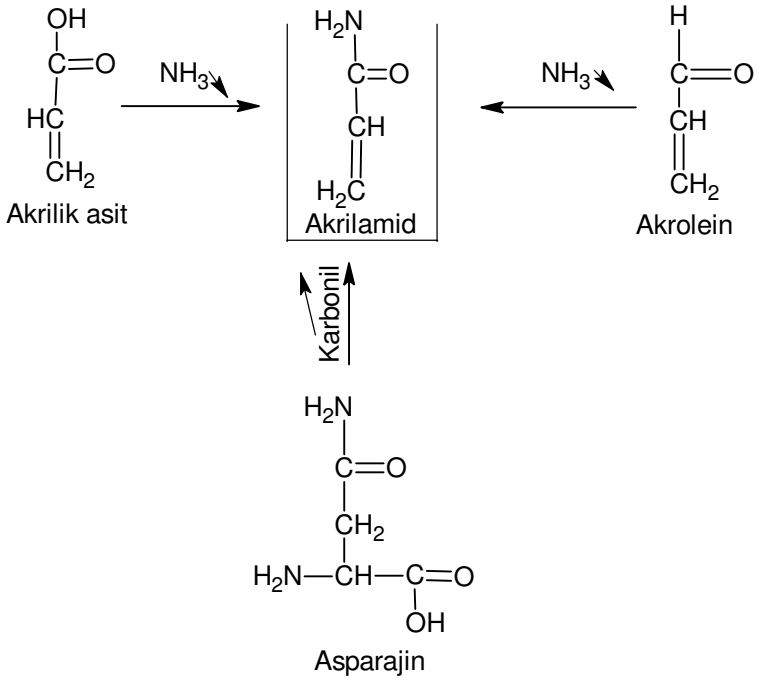


Şekil 2.4. Akrilamid, renk ve flavor bileşiklerinin Maillard reaksiyonuyla üretiminin şematik gösterimi (17,18).

Gıdalarda akrilamid oluşumu genel olarak maillard reaksiyonu üzerinden meydana gelmekte olup birkaç alternatif yol da bulunmaktadır. Özellikle yağlara uygun olmayan

yüksek sıcaklık uygulandığında, gliserolün dehidrasyonu sonucu akrolein ve akrilik asit oluşumu görülmektedir (13).

Uygun şartlar altında akrolein, asparajinle birlikte dikkate değer oranda akrilamid oluşturmaktadır. Akrolein yapısal olarak akrilamide benzeyen ve kızartma işlemi sırasında yağda oluşan bir maddedir. Ayrıca nişasta, şeker, aminoasit ve proteinlerin sıcaklıkla yıkımı esnasında akrolein oluşumu görülmektedir. Akroleinden akrilamid oluşumunun, akroleinin amonyakla (NH_3) reaksiyonu sonucunda olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyondaki NH_3'ün asparajin ve glutamin gibi amino asitlerden Strecker degradasyonuyla ortamda bulunduğu düşünülmektedir (21). Lipidlerin hidrolizi ve oksidasyonu akrolein oluşumunu arttırmaktadır. Akrilik asit, asparajin ve akrolein üzerinden akrilamid oluşumu Şekil 2.5'te gösterilmiştir (14).



Şekil 2.5. Akrilik asit, asparajin ve akrolein üzerinden akrilamid oluşumu (14).

2.4. Akrilamid Oluşumuna Etki Eden Faktörler

2.4.1. İndirgen Şekerler

Nişasta, laktoz, maltoz ve sakkaroz gibi şekerler 100 ^{0}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hafif asidik ortamlarda kolayca hidrolize olurlar. Bu nedenle kompleks karbonhidratlardan oluşan monosakkaritlere sürekli uygulanan termal işlem sonucunda monosakkaritlerin varyasyonlarıyla asparaginden akrilamid oluştuğu ispat edilmiştir (12,15). Akrilamid veriminin gıdadaki glukoz ve fruktoz düzeyleri ile orantılı olduğu bildirilmiştir (22,23).

Akrilamidin serbest kalması için reaksiyonu başlatanın fruktoz, galaktoz, laktoz, sakkaroz olduğu belirlenmiştir (18). Glukoz, fruktoz ile karşılaştırıldığında fruktozun; asparagin-şeker sistemindeki ya da kurutulmuş patates veya buğday ununa eklenen glukozdan daha yüksek akrilamid verimine sahip olduğu gözlenmiştir (13, 22, 24).

2.4.2. Amino Asitler

Gıdaların asparajin ve indirgen şeker konsantrasyonu ile ısıl işlem sonrası içerdikleri akrilamid miktarı arasındaki ilişki belirlenmiştir. Asparajin içeriği patatesteki toplam amino asidin % 40'nı, buğday ununun toplam serbest amino asidinin % 14'nü ve yüksek protein içeren çavdarın toplam serbest amino asidinin % 18'ni oluşturduğu gözlenmiştir. (14,25). Asparajin /glukoz oranının 0.5 equimolarda akrilamid oluşumu için uygun olduğu gözlenmiştir (13,24).

Genel olarak amino asidler ve asparajin ısıl işlem görmüş gıdada akrilamid oluşumunda birincil rol oynadıkları halde, akrilamid içeriği patates yumrusu içerisindeki asparajinin konsantrasyonuyla birlikte ya da toplam amino asid içeriğiyle doğrudan ilişkili değildir (23). Bununla birlikte buğday ve çavdar ununda akrilamid ve asparajin seviyesi arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca düşük asparajin içeren buğday ununa fruktoz eklenmesi ve fruktoz içeriğinin, mayalanmamış ekmeğin kabuğundaki akrilamid içeriğine etki etmediği gözlenmiştir, oysa asparajin eklenmesi akrilamid içeriğini önemli seviyede arttırmaktadır (26). Böylece asparajinin tahıllarda akrilamid oluşumu için belirleyici role sahip olduğu görülmektedir (22, 26, 27).

Patates içerisindeki serbest asparajin içeriği genel olarak şekerlerden daha fazladır, oysa buğday ve çavdar için asparajin içeriği oldukça azdır. Diğer amino asidlerden akrilamid oluşumu asparajinden daha belirgin değildir. Glutamin, metionin, sistein, aspartik asit, glutamik asit içeren amino asit karışımları veya serin, treonin, alanin, fenilalanin, prolin içeren amino asit karışımlarından oluşan model sistemlerde akrilamidin hiç bulunmadığı ya da iz miktarda bulunduğu kaydedilmiştir (14,18,24).

2.4.3. pH Değerinin Etkisi

Akrilamid oluşumu, Maillard reaksiyonu gibi sistemin pH'ına bağlıdır. pH hem şeker hem de amino grubu reaktifliğine etki eder. Yüksek pH, şekerin açık zincir formunu ve proton transferi olmayan amino gruplarını reaktif formlar olması için destekler. Akrilamid oluşması için optimum pH değeri 7-8 civarındadır (28).

Asparajin ve glukoz içeren bir model sistem içerisinde akrilamid oluşumu, % 99 pH düşürücü fosfat tamponu kullanılarak pH'ın 7'den 4'e düşürülmesi ile azaltılabilir (29). pH düşürücü kullanılarak asparajinin protonlaşmamış serbest amino grubu, protonlaşmış aminlere dönüşür. Böylece akrimamid oluşumunda önemli bir adım olan Schiff bazının oluşumu engellenir (28).

Sonuçlar, pH düşürücü kullanılarak, % 0.1-0.2 veya % 1-2 sitrik asit çözeltisi içerisindeki pişmiş veya kızarmış mısır cipsi ve patates kızartmasının akrilamid içeriğinin düşük olduğunu göstermiştir (29).

2.4.4. Nem ve Su Aktivitesinin Etkisi

Akrilamid oluşumu nem miktarından da etkilenir. Maillard reaksiyonunun en verimli olduğu nem % 12-18 arasındadır (30). Amrein (6), akrilamid oluşumunun patateslerde suyun büyük bir kısmının buharlaşması ile güçlü bir artış gösterdiğini tespit etmiştir. Ancak düşük nem, sadece oluşumda değil, eliminasyonun hızlandırılması ve patatesteki net akrilamid miktarının sabit tutulmasında da etkilidir (22).

Beyaz buğday unu hamurunda patates ile karşılaştırıldığında farklı bir performansta olduğu görülmektedir. Hamur yaklaşık % 10 su içerdiğinde, kuru hamura göre bir on kat daha düşük akrilamid içeriğine sahiptir (22). Patates dilimlerinde kızartma sırasında iç kısımdaki suyun buharlaşmasıyla bu kısımdaki sıcaklığın düşmesinden dolayı akrilamid iç kısımdan daha çok yüzeyde oluşmaktadır (31). Summa ve ark. (32) bisküvilerle yaptıkları çalışmada, nem içeriği ile akrilamid oluşum miktarı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Buna göre nem miktarı azaldıkça akrilamid miktarı üssel olarak artmaktadır.

2.4.5. Isıl işlemin Etkisi

Akrilamid oluşumu sıcaklıktan da etkilenmektedir. Birkaç araştırma akrilamidin gelişmesi için 120 ^{0}C'den daha yüksek sıcaklığın gerektiğini göstermiştir. Ortam sıcaklığı 160-180 ^{0}C olduğunda ise akrilamid oluşumunun en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir (14,33).

Ekmekler 270 ^{0}C'de 15 dakika yüksek miktarda fruktoz ve asparagin ilave edilerek fırınlandığında, akrilamid içeriğinin ekmek kabuğunda çarpıcı derecede arttığı ancak renk değişiminin önemli derecede olmadığı belirlenmiştir (26). Gökmen ve ark. (34), akrilamid miktarının artışında kızartma sıcaklığının yanı sıra kızartma süresinin de etkili olduğunu; ancak kızartma sıcaklığının, kızartma süresinden daha etkili olduğunu belirtmiştir. Sabit kızartma süresinde kızartma sıcaklığı arttıkça akrilamid miktarındaki artışın üssel; sabit kızartma sıcaklığında kızartma süresine bağlı artışın ise lineer özellik gösterdiğini tespit etmiştir.

2.4.6. Depolama Koşulları

Depolama koşulları da akrilamid oluşumunu etkilemektedir. Patates yumrularının 8-10 ^{0}C'de soğutulması nişastadaki serbest indirgen şeker miktarını arttırır. Bu işlem düşük sıcaklıkta şekerlenme (LTS=Low Temperature Sweetening) olarak bilinir. Serbest şekerler patatesi donmaya karşı korur. Yüksek indirgen şeker konsantrasyonu akrilamid oluşumunu arttırır (22,34,35,36).

2.5. Farmakokinetik Özellikler

Akrilamidin insanlardaki farmakokinetiği ile ilgili veriler sınırlıdır. İnsanlarda görülen klinik bulguları deney hayvanları ile yürütülen çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğundan, türler arasında benzer farmakokinetik özellikler olduğu düşünülmektedir (37,38,39).

2.5.1. Absorbsiyon

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda maruziyeti takiben akrilamidin hızla ve yaygın olarak emildiğini göstermiştir (37).

2.5.2. Dağılım ve Bağlanma

Yapılan çalışmalarda akrilamidin yaygın bir şeklide dokulara dağıldığı ve plesantadan geçtiği gösterilmiştir (38).

Carlson ve Weaver tarafından yapılan çalışmada (39), akrilamidin DNA ve RNA ve proteinlere bağlandığı gösterilmiştir. DNA ve RNA'ya bağlanma en fazla karaciğerde, proteinlere bağlanma ise deri örneklerinde görülmüştür.

2.5.3. Metabolizma

Akrilamid 2 ana yolla metabolize olur. Ana yol, karaciğer ve beyinde gerçekleşen glutatyon-S-transferaz enzimi ile katalizlenen glutatyon konjugasyonudur. Konjugasyon sonucu, N-asetil-S-(3-amino-3-oksipropil) sistein metabolitinin oluştuğu bu yolun detoksifikasyon prosesi olduğu düşünülmektedir. İkinci yol ise CYP450 2E1 aracılığı ile reaktif epoksit metaboliti olan glisidamide biyotrasformasyondur. Glisidamid glutatyon konjugasyonu ve\veya glisidamide ileri metabolizasyona (hidroliz) uğrayabilir. Akrilamide maruz kalan insanlardan ve hayvanlardan alınan kan ve doku örneklerinde akrilamidin hemoglobin ile glisidamidin ise DNA ve hemoglobin ile bağlandığı tespit edilmiştir (40,41). Glisidamid ayrıca hayvan idrarında tespit edilmiştir, bu da glisidamidin stabil bir epoksid metaboliti olduğunu göstermektedir. Glisidamidin karsinojenik ve genotoksik etkiler açısından akrilamidden daha etkili olduğu gösterilmiştir (42,43). Hayvanlarda yapılan toksisite çalışmalarındaki doz aralıklarında,

akrilamidin glisidamide dönüşümünün vücuttaki akrilamid miktarı ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir (44).

Bergmark tarafından yapılan bir çalışmada (40), elektroforezde kullanılmak üzere poliakrilamid jel hazırlanması sırasında akrilamide maruz kalan laboratuvar personelinin kan örneklerinde akrilamid-Hb bağlanmalarına rastlanmıştır.

2.5.4. Eliminasyon

Yapılan çalışmalarda, akrilamidin büyük çoğunluğunun idrar ve safrada metabolit olarak atıldığı gösterilmiştir. Safra metabolitlerinin enterohepatik siklusu nedeniyle feçes ile atılım çok azdır (45).

Yapılan başka bir çalışmada, 1,10 veya 100 mg\kg dozlarda sulu çözelti şeklinde (2,3-^{14}C) akrilamid uygulanan erkek sıçanlarda uygulanan dozun % 53-67'si 24 saat içerisinde idrarla ve feçesle atıldığı, 7 gün sonunda uygulanan dozun % 65-82'sinin elimine edildiği, atılımın % 74'ünün idrarla ve % 8'inin feçesle gerçekleştiği bildirilmiştir (46).

Akrilamidin yemekle vücuda alınıp idrarla dısarı atılmasına yönelik olarak deneklerin idrarlarında yapılan değerlendirmede; 0,94 mg akrilamid içeren gıdanın vücuda alımından 72 saat sonra % 60'ı idrarda bulunmuştur (47).

2.6. Çeşitli Gıdalardaki Akrilamid Miktarları

2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Merkezi tarafından yüksek sıcaklıkta işlem görmüş gıdalarda akrilamidin yüksek boyutlarda oluştuğunu ortaya koyan bir rapor yayınlanmıştır. İsveç'te başlayan bu araştırma 2002 yılında Birleşmiş Milletlerin gündemine taşınmış ve Birleşmiş Milletlere bağlı Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) çeşitli ülkelerle, çeşitli programlar organize etmiştir. Hollanda, İsviçre, Norveç, İngiltere ve ABD gibi ülkelerde pişirilmiş ve sıcakta işlem görmüş gıdaların pek çoğunda akrilamidin oluştuğunu ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır. Akrilamidin insanlarda ve laboratuvar hayvanlarında nörotoksik etkisi kanıtlanmıştır. Yine laboratuvar hayvanlarında kötü huylu tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. İnsanlardaki kanser oluşumuyla henüz bir bağlantısı kanıtlanmasa da Uluslararası Kanser

Araştırmaları Kurumu (IARC) gıdalardaki akrilamidi 'insanlar için potansiyel kanserojen maddeler' arasına almıştır (48).

2002 yılı WHO verilerine göre Norveç, İsveç, İngiltere ve Amerika'dan alınan çeşitli gıdalardaki akrilamid miktarları Tablo 2.2'de verilmiştir (49).

Tablo 2.2. Farklı ülkelerde üretilen çeşitli gıdaların akrilamid miktarları (49).

Gıda\Ürün Grubu	Akrilamid seviyeleri **(µg/kg)**	
	Minimum-maksimum	**Örnek sayısı**
Cips, ince dilimlenmiş ve kızartılmış patates	170-2287	38
Kalın dilimlenmiş ve kızartılmış patates	<50-3500	39
Unlu ürünler	<30-42	2
Fırın ürünleri	<50-450	19
Bisküvi, kraker, tost	<30-3200	58
Kahvaltılık tahıllar	<30-1346	29
Mısır cipsleri	34-416	7
Taze ekmek	<30-162	41
Parçalanmış ve inceltilmiş deniz ürünleri	30-39	4
Parçalanmış ve inceltilmiş kanatlı etleri	39-64	2
Malt içecekleri	<50-70	3
Çikolata tozu	<50-100	2
Kahve tozu	170-230	3
Bira	<30	1

Yapılan araştırmalar kapsamında çeşitli gıdalarda akrilamid miktarları belirlenmiş ve akrilamidin yüksek nişasta içeriğine sahip gıdalarda yüksek oranda oluştuğu görülmüştür (50). Tablo 2.3'de görüldüğü gibi FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

tarafından yapılan analizlerde kızarmış patates ürünlerinin akrilamid içeriği diğer ürünlere göre oldukça yüksektir.

Tablo 2.3. Çeşitli gıdalara ait FDA akrilamid verileri (50).

Gıda\Ürün Grubu	**Akrilamid seviyeleri (µg/kg)**
Patates cipsi	117-2762
Parmak Patates	20-1325
Tahıl Gevreği	52-266
Ekmek	<10-364
Bisküvi ve Kraker	26-504
Meyve ve Meyve Suyu	<10-70
Kahve ve Çay	175-351
Süt ve Süt Ürünleri	<10-43
Bebek Mamaları ve Karışımları	<10-130
Toz İçecek Karışımları	<10-1184

Meyve ve sebzelerin çiğ ya da haşlanarak tüketildiği zaman akrilamid açısından herhangi bir risk taşımadığı bildirilmiştir (51). Yapılan çalışmalarda kızartma, fırınlama ve ızgara gibi yöntemlerle pişirilen gıdalarda uygulanan işlem süresi ve sıcaklığına bağlı olarak akrilamidin oluştuğu tespit edilmiştir (52).

2.7. Akrilamidin İnsan Ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalara göre; akrilamid, farklı organlarda (tiroid, adrenal bez, tunika vaginalis) benign ve malign tümörlere yol açabilmektedir. Ayrıca beyin-spinal kord tümörleri, akciğer, deri ve pankreas kanserlerine neden olabileceği de bildirilmektedir (53).

Fareler ve sıçanlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalarda, hayvanların gıda yolu ile belirli dozlarda akrilamide maruz kalmaları sonucu, akciğer, meme bezi, ağız boşluğu ve bağırsakda kanser riski olabileceği tespit edilmiştir (54).

Akrilamidin fareler üzerinde yapılan bir seri deneyler sonucunda genetik materyale zarar verdiği, uzun periyotlu uygulamaların özellikle adrenal bezleri ve testislerde tümör oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür. Tüm bu gözlemler akrilamidin hayvanlarda genotoksik karsinojen özellikte olduğu sonucunu doğurmuştur. Güvenlik sınırını tespit etmek mümkün olamamıştır, ancak çok düşük seviyelerde bile risk taşıyabileceği tahmin edilmektedir (55).

Akrilamid ve metaboliti glisidamidin organizma içinde ve dışında kanserojenik ve genotoksik etkiler gösterdikleri saptanmıştır (56).

Akrilamid ayrıca sinirler üzerinde de olumsuz etki yaratmaktadır. Çin'de işçilerin akrilamide maruz kalmaları sonucu zayıf bacaklar, ayak parmaklarının refleksini ve duyarlılıklarını kaybetmesi, uyuşmuş eller gibi belirtilerin gözlemlendiği bildirilmiştir. Nöropatiyi takiben serebellar disfonksiyon (beyincik ile ilgili dengesel bozukluk) içeren daha ciddi belirtiler gözlendiği ifade edilmektedir (57). İşçilerin, periferal nöropati (his bozukluğu) belirtileri sergilemesi bu bileşiğin insan üzerinde nörotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir (58,59,60).

Akrilamidin cilde temasında cilt kanseri, solunduğunda ise, akciğer kanseri riskini arttırabileceği belirtilmektedir (61).

Veteriner Literatürlerde akrilamid toksikasyonuna ilişkin klinik raporlar oldukça azdır. Deneysel olarak ise akrilamid toksikasyonu ratlarda primatlarda ve köpeklerde iyice araştırılmıştır. Sekiz hafta süresince oral akrilamide maruz bırakılan Greyhound ırkı köpeklerde, diğer türlerde akrilamid nöropatisi ile görülen benzer özelliklerde sensorimotor periferal nöropati gelişmiştir. Hayvanların çoğunda klinik ve radyolojik megaözafagus belirtileri gelişmiştir. Nöropati ve megaözafagusun ilişkisi, vagusun aksonopatisi bu bozukluktaki etiyolojik faktör olabileceğini ortaya koymuştur (62).

Bir diğer raporda ise (63), sağlıklı üç Labrador yavrusu yanık mısır lapası yedikten kısa bir süre sonra ataksi, hipermetri ve konvülziyon geliştiği bildirilmiştir. Zehirlenme belirtisi görülen üç yavrunun yüksek sıcaklıkta hazırlanan nişasta bazlı besin maddelerini yedikten sonra sinirsel semptomların bulunması akrilamid toksisitesini

düşündürmüştür. Bunu takiben iki yavrunun ölmesi ise durumun ciddiyetini artırmış ve ölümlerin özellikle distal aksonopatiden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir.

Kedilerde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ise, akrilamid monomerinin ölümcül dozda intravenöz uygulandığında (100 mg/kg yetişkin kedi), yoğun tonik klonik konvülziyonlar ve diffüz santral sinir sistemi eksitasyonu rapor edilmiştir. Akrilamidin letal dozların altındaki doz uygulaması ise, ataksi ve tremorları tetiklemektedir (64).

Akrilamid ile ilgili diğer hayvan türlerinde de çalışmalar mevcuttur. Yetişkin erkek Beagle köpekleri ve minyatür domuzlar 1 mg akrilamid/kg/gün şeklinde 3-4 hafta beslendikleri takdirde, nörotoksik belirtiler ortaya çıkmamıştır, ama deney hayvanlarının postmortem muayenesinden sonra toplanan kas dokusunda akrilamid tespit edilmiştir. Akrilamid monomeri için primer hedef sinir sistemi olmasına rağmen, bu maddenin yalnızca %1'inden azı beyinde tespit edilmiştir. Akrilamid 5 mg/kg/gün (30-60 gün periyodunda) köpek ve domuzlara uygulandığında, nöropati gözlenmiştir (65). Köpeklerin kronik olarak maruz kalması, ataksi, zayıflık ile özellikle vagal sinir aksonopatisine bağlı megaözafagusu da içeren tipik progresif sensorimotor periferal nöropatiye yol açar (66). Ölümcül dozların altındaki doz uygulaması kesildiğinde, gelişen nöropati yavaş yavaş çözülebilir. Spastisite ve serebellar ataksi gibi daha şiddetli bozuklukların ise geriye dönüşü olamayacağı ve kalıcı olacağı rapor edilmiştir (67,68).

2.8. Akrilamidin Günlük Alım Seviyesi Ve Yasal Uygulamalar

Gıdalarla akrilamidin kısa dönem alım miktarı istatistiksel olarak, Hollanda ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde incelenmiş ve gıdalar ile akrilamidin günlük alım miktarı ortalama olarak 0,3-2 µg/kg/gün olarak bildirilmiştir. Uzun dönem alım miktarı ise populasyonda yaş, ırk gibi biyolojik etkilere ya da gıda tüketim alışkanlıklarına göre değiştiği bildirilmektedir (69). Akrilamide yeraltı ve yüzey sularında rastlanmaktadır. Suların arıtılması işleminde sudaki istenmeyen maddeleri filtre etmek amacıyla temizleyici ajan olarak da kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA)'nın yaptığı tespite göre; sularda 0,5 µg/L akrilamid ile karşılaşılmıştır. Bu değerin üzerindeki miktarların kontaminasyona neden olduğu bildirilmiştir (70). İçme sularında yapılan analizler sonucu, Codex Alimentarius ve Türk Gıda Kodeksine

göre; belirlenen yasal sınır değer 0,1 µg/L parametrik değer (Madde 98/83/EC) olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.4. Avrupa Birliğinde akrilamide ait izin verilen üst sınırlar (18).

Bulunduğu yerler	**Akrilamid**
Gıdalar	0,5-0,8 µg/kg/gün (ortalama 70 kg ağırlığında bir insan için 35-56 µg/kg)
Su	0,1 µg/L
Paketleme materyalleri	10 µg/kg
Hava	30 µg/m^3
Kozmetik ürünler	0,1-0,5 mg/kg,

Türk Gıda Kodeksinin **(Tebliğ No: 2005/31)** Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde verilen SML=ND (DL=0.01 mg/kg) değerleri gereğince, akrilamidin Spesifik Migrasyon Limiti (SML) tespit edilemeyene eşit (ND) olarak verilmiş ve (DL) analiz metodunun tespit limiti 0,01 mg/kg olarak belirlenmiştir. Spesifik Migrasyon limiti, gıdalara temas eden plastik madde veya malzemelerden, gıdaya geçebilen akrilamid'in en yüksek yasal seviyesi olarak tanımlanmaktadır (71).

Aynı zamanda Avrupa Komisyonu (EC), Avrupa Gıda Güvenliği Dairesi (EFSA)'nin 2007-2008 yılları arasında gerçekleştirdiği Gıdalarda Akrilamid İzleme Programı'' verilerinden yola çıkarak çok tüketilen bazı gıdalar için Tablo 2.5'de görüldüğü gibi **Gösterge Değerler''** adı altında bir liste yayımlamıştır. "Gösterge Değerler" akrilamid için maksimum limit değerleri olmayıp, yetkili merci için bu değerler aşıldığı zaman sorunun nerede olduğuna dair yardımcı olacak bir rehber niteliğindedir. Bir üründe bu değerler aşıldığı zaman o bölgedeki yetkili makam o verileri ilgili operatörden alıp Avrupa Komisyonu yetkililerine rapor etmekle yükümlüdür. Bu veriler ilerde maksimum limitlerin düzenlenmesine ve gıdalarda akrilamidin azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (72).

Tablo 2.5. Gıdalarda akrilamid için gösterge değerleri (72).

Gıda Maddesi	**Gösterge Değer** (µg/kg)
Kızartılmış Fransız patatesi	600
Patates cipsi	1000
Ekmek	150
Kahvaltılık tahıllar	400
Bisküvi, kraker vb.	500
Kavrulmuş kahve	450
Hazır kahve	900
Bebek maması (pişirilmiş tahıl bazlı olanlar hariç)	80
Bisküvi ve galeta (çocuklar için)	250
Pişirilmiş tahıl bazlı gıdalar (çocuklar için, bisküvi ve galeta hariç)	100

2.9. Akrilamid Analiz Yöntemleri

Akrilamid monomerini belirlemek için son yıllarda birçok metot geliştirilmiştir. Literatür taraması yapıldığında akrilamid analizlerinin GC, GC-MS, HPLC, LC-MS/MS, bunların dışında Elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi, biyosensör kit yöntemi, NIR yöntemi, ELISA yöntemi ile yapıldığı ifade edilmektedir (73-77).

Şimdiye kadar uygulanan analiz yöntemlerinden kromatografik teknik olarak başlıca Gaz Kromatografisi (GC) veya Sıvı Kromatografisi (LC); tanımlama tekniği olarak da Kütle Spektrometresi (MS) kullanılmıştır (78).

En yaygın kullanılan yöntemler ise Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) / İkili Kütle Spektrometresi (MS) [LCMS/MS] yöntemleridir (79). Akrilamid analizinde örnek hazırlama aşaması önemlidir. Analizlerde öncelikle gıda matriksine bağlı olarak örnek kurutulur ve öğütülür. Örnek hazırlama aşamasının başlangıcında işaretlenmiş akrilamid izotopu

eklemek, ön işlem sırasında örnek içindeki akrilamid kaybının analiz sonucunu etkilememesi için yapılan bir uygulamadır; bu amaçla kullanılan en yaygın iç standartlar izotop etiketli [$^{13}C_3$] akrilamid, [D_3]- akrilamid ve [$^{13}C_1$] akrilamiddir (79).

Avrupa'nın önde gelen laboratuarlarından DLA (Dienstleistung Lebensmittel Analytik) ve CSL (Central Science Laboratory) Avrupa Birliği üyesi ülkelerdeki akredite laboratuvarların akrilamid analizlerindeki performanslarını ölçmek için laboratuvar yeterlilik test numuneleri hazırlamaktadırlar. Tablo 2.6'da bu testlere katılan laboratuvarlar ve bu laboratuvarların akrilamid analizinde kullandığı metodlar listelenmiştir.

Tablo 2.6. Avrupa Birliği üyesi ülkelerde akrilamid analizi için kullanılan yöntemler (79)

Üye ülke	**LC-MS veya LCMS/ MS**	**LC-UV**	**GC-MS (EI/CI)**	**GC-MS (Br türevlendirmeli)**
Avusturya				X
Belçika	X			
İsviçre	X		X	X
Çekoslovakya			X	
Danimarka	X			
Almanya	X	X	X	X
İspanya				X
Fransa	X			
Finlandiya	X			
Yunanistan			X	X
İrlanda				X
İtalya				X
Norveç	X			
Hollanda	X			X
İngiltere	X			X

Yaygın olarak kullanılan analitik metotlar arasındaki en büyük farklar; akrilamidin *ekstraksiyon* (ekstraksiyon çözgeninin içeriğindeki değişkenler, ekstraksiyon sıcaklığının ve süresinin tanımlanması, mekanik uygulamalar) (79) ve *temizleme* aşamalarındadır. Çoğunlukla su ekstraksiyonu kullanılmaktadır. Çünkü akrilamid yüksek oranda suda çözünmekte organik çözücülerde daha az çözünmektedir (80). Ekstraksiyon işlemlerinde çok fazla farklılıklar vardır. Temizleme işlemi örnek hazırlama aşamasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır mümkün olduğunca kolay, güvenilir ve farklı gıda çeşitlerine uygulanabilir olmalıdır (80). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğu ile en çok tercih edilen yöntemdir. Aynı zamanda LC-MS esaslı metotlar geliştirilmiştir. Bu metotların avantajı türevlendirme yapmadan akrilamid analiz edilebilmektedir (78,81). Fakat akrilamidin molekül ağırlığının düşük olması (71 g/mol) ve düşük kaliteli iyon parçacıkları vermesinden dolayı akrilamidin teşhisinin doğru yapılabilmesi için ikili kütle spektrometresine (MS-MS) ihtiyaç duyulmaktadır (81). GC metodu, nişastaca zengin örneklerle çalışırken nişastanın güçlü jelatinasyon özelliğinden dolayı başarısız olmaktadır; bunun yanında GC ile ilgili temizleme, türevlendirme ve standardın stabilizasyonu hakkında detaylı bilgi mevcut değildir. Bu sorunun üstesinden gelmek için yüksek kaliteli iyonlar sağlamada GC-MS'den yararlanılan yeni bir analitik metot geliştirilmiştir. Bu metotta türevlendirme (bromlama) işleminin kullanılmasıyla daha uçucu bir bileşik oluşturulmakta ve tanımlama seçiciliği artmaktadır (79,81). Bromlama işlemi potasyum bromür (KBr), hidrojen bromür (HBr) ve bromlu (Br_2) su eklenerek yapılmaktadır; bu bromlama basamağının zahmetli ve zaman alıcı (79) olması nedeniyle alternatif bir bromlama tekniği de potasyum bromat ($KBrO_3$) ve KBr kullanılarak yapılmaktadır ve aşağıdaki reaksiyon gerçekleşmektedir;

$$KBrO_3 + KBr\ H_2SO_4 \longrightarrow Br_2 + K_2SO_4 + H_2O$$

$$\underset{\text{(akrilamid)}}{CH_2 = CH - CO\text{-}NH_2} + Br_2 \longrightarrow \underset{\text{(2,3 - dibromopropionamid)}}{CH_2Br\text{-}CHBr\text{-}CO\text{-}NH_2} + \underset{\text{(2 - bromopropionamid)}}{CH_2 = CBr\text{-}CO\text{-}NH_2}$$

Bu türevlendirme tekniğinin birçok avantajı vardır; güçlü bir asit olan (HBr) ve doygun bromlu çözelti hazırlamaya gerek yoktur. Bu iki solventin hazırlanması zordur ve el ile

teması tehlikelidir. $KBrO_3$ ve KBr birleşiminin kullanımı daha kullanışlı ve güvenlidir ve reaksiyon soğuk depo sıcaklığında 30 dakikada mükemmel tekrarlanabilirlik verecek şekilde gerçekleşmektedir. Ayrıca akrilamidin ($KBrO_3$ ve KBr) birleşimi ile elde edilen türevi mükemmel GC özellikler sergilemekte, keskin pik şekilleri elde edilmektedir. Bu türevlendirme basamağının dezavantajları bu bilesimin karışık kompozisyonlu solvent olması ve bunun da türevlerin reaksiyon ürünlerini etkileyebilmesidir. Bu yüzden enstürmental analiz öncesi son basamak olarak bir temizleme ekstraktı uygulanmalıdır (82). Bromlama basamağı ile akrilamid *2,3-dibromopropionamide* dönüşmektedir. Fazla brom, sodyum tiyosülfat (1N) çözeltisi eklenerek uzaklaştırılmaktadır ve 2,3-dibromopropionamide etil asetatla ekstrakte edilmektedir. Bu akrilamid türevi bir ileri uygulama ile daha stabil bir analit olan *2-bromopropionamide* trietilamin (% 10) eklenerek dönüştürülebilmektedir. Fakat bazı koşullarda 2,3-dibromopropionamid'in GC'in girişinde veya direkt olarak kapiler kolonda daha stabil olan 2-bromopropionamid'e dönüştüğü de görülmüştür (81). Bir de türevlendirme yapılmadan ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinden sonra akrilamidin GC-MS'de direkt teşhis edildiği metot vardır (79).

GC-MS metodunda daha çok pozitif iyon kimyasal iyonizasyon (CI) ve impact iyonizasyon (EI) içeren kütle spektrometresi kullanılarak akrilamid teşhis edilmekte ve miktar tayininde de selected ion monitoring (SIM) metodu tercih edilmektedir (22). Ayrıca akrilamid gaz kromatografisi ikili kütle spektrometresi (GC/MS-MS) ile teşhis edilebilmektedir. (79) kimyasal iyonizasyon metoduyla akrilamidin teşhis limitini 1-2 µg/kg'a kadar düşürmüşlerdir. Fakat yapılan bir çalışmada (82), gaz kromatografisi – elektron yakalama dedektörü (GCECD) yönteminin MS/MS bazlı yöntemlerden biraz daha hassas olduğunu göstermişler ve bu yöntemin avantajı olarak da akrilamid türevinin temizleme işlemi olmadan enjeksiyon yapılabilmesini, daha ucuz ve güvenilir bir alternatif yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Her ne kadar gıdalarda akrilamid analizi ile igili en çok kullanılan metodlar LC ve GC kökenli olsa da, bunların dışındaki cihazların kullanıldığı çalışmalar da yapılmıştır.

Yapılan bir çalışmada patates cipslerindeki akrilamid düzeylerinin belirlenmesi için Micellar Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MEKC) kullanılmış ve oluşturulan

yöntemin geri kazanım oranı % 90,86-99,6 arasında bulunurken, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,1 µg/ml ve 0,33 µg/ml olarak bulunmuştur (73).

Bir başka çalışmada, kahvedeki akrilamid miktarının tespiti için LC-MS ve biyosensör kit yöntemi karşılaştırılmış ve kit yönteminin pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir (74).

Başka bir çalışmada, NIR (Near Infrared Specktroscopy) yöntemi ile 60 tane patates cipsi örneğinde akrilamid analizi yapılmış, ancak gerçek değerlerle bulunan değer arasındaki korelasyonun 0,83 olduğu belirtilmiştir (76).

Gıdalarda akrilamid düzeylerinin tespiti için ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) cihazı ile yapılan bir diğer çalışmada LOD değeri 18,6 ng/ml bulunurken, geri kazanım oranının ise % 74,4-98,1 aralığında olduğu bildirilmiştir (77).

2.10. Köpek ve Kedi Yemleri

Yaşayan tüm canlılarda olduğu gibi kedi ve köpeklerde hayatta kalabilmek, sağlıklı olabilmek ve üreyebilmek için besin maddelerine gereksinmeleri vardır. Kedi ve köpek yiyeceklerinde bulunması gereken besin maddeleri Tablo 2.7'de verilmiştir.

Yemlerin yapısında yer alan besin maddeleri aşağıdaki gibi sıralanır: (83).

1. Su
2. Karbonhidratlar
3. Yağlar
4. Proteinler
5. Vitaminler
6. Mineral maddeler

Tablo 2.7. Kedi ve köpek yiyeceklerinde bulunması gereken besin maddeleri (%) (84).

Besin maddesi	Kuru maddede		Kuru yiyecekte		Konserve veya yaş yiyecek	
	Kedi	Köpek	Kedi	Köpek	Kedi	Köpek
Kuru madde	100	100	91	91	28	28
Protein	28	22	25.5	20	8	6.7
Karbonhidrat (max.)	20	71	18.5	65	6	20
Yağ	9	5.5	8.2	5.0	2.5	1.5
Ca	1.0	1.1	0.9	1.0	0.3	0.3
P	0.8	0.9	0.73	0.8	0.22	0.24
K	0.8	0.9	0.73	0.8	0.22	0.24
NaCl	1.0	1.5	0.9	1.4	0.3	0.43

Köpekler hayvansal kaynaklı yemleri olduğu kadar bitkisel kaynaklı yemleri ve bitkisel sanayi yan ürünlerini de değerlendirebilen hayvanlardır. Kedi diyetlerinin önemli bir kısmının ise hayvansal kökenli olma zorunluluğu vardır. Köpek ve kedi diyetlerinde yer alan yem ham maddeleri 4 grupta toplanabilir: (85)

1- Et ve balıklar,

2- Süt, süt mamulleri ve yumurta,

3- Tane yemler ve sebzeler,

4- Katı ve sıvı yağlar,

1- Et ve balıklar

Köpeklere verilen diyetin 1/3'ü sığır, koyun, at, domuz, balık ve tavuk mezbaha yan ürünlerinin pişirilip, kurutulup, öğütülmüş unlarından oluşmaktadır. Kanatlı mezbaha yan ürünleri giderek daha fazla miktarda köpek diyetlerinde yer almaktadır (86).

2-Süt, süt ürünleri ve yumurta

Bu grup yemlerin protein ve amino asit profilleri et ve balıktan daha iyidir.Yetişkin köpek ve kedilerin süt şekeri olan laktozu tolere edemedikleri unutulmamalıdır. Süt, birçok besin maddesi bakımından iyi bir gıda olmakla birlikte demir ve bakır elementleri ile C vitamini bakımından yetersizdir. Yağsız sütte yağda eriyen vitaminler az buna karşılık protein ve laktoz düzeyi yüksektir. Krema, yağ ve yağda eriyen vitaminler bakımından iyi bir kaynaktır. Proteinlerindeki biyoyararlılık bakımından yem materyali; Yumurta, süt, süt mamulleri >et, balık> sebze tahıllar olarak sıralanır. Yumurta köpek ve kediler için değerli bir gıdadır. Yumurta protein, yağ, A, D, B2, folik asit, B12 vitamini ve Fe bakımından iyi bir kaynaktır (85,87).

3-Tane yemler ve sebzeler

Tahıllar bu gruptaki yiyecek maddeleri diyetlerin enerji kaynağını oluşturur. Başlıca örnekleri buğday, arpa, yulaf, çavdar, pirinç, darı ve mısırdır. Değerlilikleri bakımından şu şekilde sıralanabilirler;

pirinç> mısır > buğday

patates> mısır > buğday

Tahıllar köpekler için öncelikli değerlendirilebilir nişasta kaynaklarını oluştururlar. Buğdaygil tanelerinin içinde bir embriyo ve bunun etrafında nişastadan meydana gelen bir endosperm vardır. Endospermin etrafında da aleuron tabakası yer alır. Bu ince dış tabaka protein ve fosfor bakımından iyi bir kaynaktır. Değirmencilik sanayi yan ürünlerinden olan kepeklerin ham selüloz miktarı fazla, enerji düzeyleri ise düşüktür Kepek ayrıldıktan sonra kalan yemeklik unların ise nişasta miktarlarına bağlı olarak enerji değerleri yüksektir. Buğdaygil taneleri genellikle % 12 su, % 8-14 ham protein, % 2-5 ham yağ ve % 70-80 karbonhidrat kapsarlar. Ham sellüloz miktarı ise tanenin çıplak ya da kabuklu (kapçıklı) olmasına göre % 2-7 arasında değişir. Bu gruptaki yem maddeleri temel olarak enerji sağlamakla birlikte protein de içerirler. (85,86).

Diyetin sindirilebilir besin maddeleri miktarında azaltma yapılmak istendiğinde, dolgu maddesi özelliği nedeniyle diyette kepeğe yer verilir. Kepeğin konstipasyonu önleyici

ve diareyi azaltıcı özelliği de vardır. Tane yemin embriyosu iyi bir protein, yağ, E vitamini ve tiyamin kaynağıdır. Buğdaygil taneleri köpek ve kediler için lezzetli değildir. Yalnız pişirildiklerinde ve suyla yumuşatıldıklarında diyetin bir bölümünü oluşturabilirler. Genel bir ifade olmak üzere günlük diyetlerinde kediler 4-5 g nişasta/kg canlı ağırlık ve köpeklerde 10-12 g nişasta/kg canlı ağırlıktan fazlasını tolere edemezler.

Baklagil taneleri; Bu gruptaki yemler arasında bulunan bakla ve bezelye yüksek düzeyde protein kapsamanın yanı sıra iyi bir enerji deposudur (86).

Köpek ve kedinin bu grup yemlerde mevcut karbonhidratların günlük tüketimlerine ilişkin olarak sergiledikleri farklı tolerans Tablo 2.8'de gösterilmiştir.

Yeşil sebzeler: Yeşil sebzeler köpek ve kediler tarafından iştahla tüketilmezler. Bu gruptaki yemler iyi bir vitamin kaynağı olmakla birlikte pişirilme sırasında bu özelliklerini önemli ölçüde yitirirler. Kedilerde olmamakla birlikte köpekler A vitamini gereksinmelerinin bir bölümünü sebzelerde bulunan β-karotenden karşılayabilir (85).

Tablo 2.8. Köpek ve kedilerin karbonhidrat toleransları (85)

	Tüketim (g\kg canlı ağırlık)		Diyetteki miktar % KM	
	Köpek	**Kedi**	**Köpek**	**Kedi**
Nişasta				
Dekompoze	10▪	5	40▪	24
Patates	8□	8□	35□	35□
Şekerler				
Laktoz	2-3	1°	10	5°
Sakkoroz	6-8	1°	35	5°
Stakiyos ve rafinos	1	1	5	5
Glukoz	10•	1 °	40•	5°

▪ Deneysel olarak daha fazlası yapılmamıştır.
□ Yem seçimine göre
° Ara metabolizmada sınırlanmış tolerans
• Deneysel olmayıp nişasta üzerinden tahmin edilen

4- Katı ve sıvı yağlar

Bu grup yem maddelerine tereyağı, iç yağları, kuyruk yağları, kızartmayı takiben arta kalan yağlar, etlerin üzerindeki kabuk yağları ve yine etlerin içerisindeki yağlar ile yağlı tohumlardan ekstrakte edilen bitkisel yağlar katılabilir. Sıvı ve katı yağların yapısında değişen oranlarda doymuş ve doymamış yağ asitleri vardır. Hayvansal yağlar köpek ve kediler tarafından iştahla tüketilir. Bunların diyete katılmaları diyetin renk, tat ve kokusunu arttırır. Yağlar aynı zamanda ezilmiş, öğütülmüş ham madde partiküllerini de bağlar ve yeme form verilmesini kolaylaştırır. Yağlar her iki tür hayvanda da yüksek düzeyde sindirilir (85).

2.10.1. Köpek ve Kediler İçin Yem Üretimi Ve Formları

Köpek ve kedilere değişik amaçlar için ve farklı formlarda yem hazırlanmaktadır (88).

Bunlar;

A- Üretici ve Tüketici Açısından,

1-Generik yemler: Bu grup yemler bir ürün ya da marka ismi taşımayan ve genellikle dar bir bölgede üretilip pazarlanan yemlerdir. Generik pet yemlerini çekici yapan düşük maliyetleridir. Bu grup yemlerin genel besin maddeleri düzeyleri yasal sınırlar içerisindedir. Generik yemlerde ayrıntılı besin maddeleri profili ve araştırmaya dayalı güvenlik sınırları bulunmaz.

2- Etiketli yemler: Bir market zinciri içerisinde satılan ve etiketleri bulunan bu grup yemler tüzüklerde gösterilen besin maddeleri düzeylerine uygun üretilir. Bu grup yemlerin üretilmeleri aşamasında dikkati çekecek uzun araştırma ve laboratuar çalışmaları yapılmamaktadır.

3-Popüler markalar: Satış alanı tüm dünyayı kapsayan bu grup yemler uzun araştırma ve laboratuar çalışmaları sonucunda üretilir. Çok ayrıntılı besin maddeleri profilleri bilindiği için her türlü kalite garantisine de sahiplerdir. Bu nedenle fiyatları daha yüksek olan popüler yemler, günümüzde gelişmiş ülkelerde tüketilen köpek ve kedi yemlerinin % 92'sini oluşturmaktadır.

4- Yalnız veteriner kliniklerde satılabilenler (prescription): Veteriner hekimlerin önerileri doğrultusunda ve belirli bir hastalığı önleme ya da tedavi amacıyla üretilmekte ve tüketilmekte olan bu grup yemlerin içerikleri sabitdir.

B- Su İçeriklerine ve Üretimlerinde Uygulanan Yöntemlere Göre (88,89,90).

1-Sulu yemler: Bunların en iyi bilinen örnekleri kutu konserveler olup temelde et ve et yan ürünleri ile balıktan üretilirler. En lezzetli konserve yemler, çok az ya da hiç bitkisel tane yem kapsamayanlardır. Bir diğer ifadeyle karbonhidrat kaynağı içermeyenlerdir. Bunlar içerisinde et ve balık parçalarıyla jöle et suyu vardır.

2- Yarı sulu yemler: Köpek ve kedilerin et ve benzeri yemlerinin suyu %15-40 'a indirilmek suretiyle muhafaza süresi uzatılabilmektedir. Bu yiyecekler lezzetlidir, üretilmeleri sırasında mısır özü ile propilen glikol kullanıldığı için de enerjileri kuru madde temelinde oldukça yüksektir. Üretilmeleri sırasında kuru ve taze ham maddeler birlikte kullanılabilmektedir.

3- Kuru yemler: Kuru yemler, köpek ve kediler için çok uygundur. Bunlar fırınlanmış bisküviler, ekstruder ve ekspanded bisküviler, kuru yem karmaları ve preslenmiş ince plaklar ile pulcuklardır. Bu grup yemlerin özellikle enerjileri yüksektir. Kuru yemlerin en büyük dezavantajları lezzetli olmamalarından kaynaklanır. Bu olumsuzluk da günümüz teknolojilerinde ekstruderlerden yağ püskürtülmek suretiyle giderilebilmektedir. Karma yemlerin yapısında yer alan tane yemler genelde tahıl taneleridir.

Bisküviler ve ince un halindeki yemler; öncelikle buğday unu başta olmak üzere, süt, kuru maya, buğday embriyosu, et unu, yağ, soya küspesi ve vitamin-mineral premikslerinin uygun kombinasyonundan üretilir. Daha geçerli olan yöntem ise ince un formundaki yemlerin peletlenmesi veya ekstürüzyondan geçirilmeleridir. Bu yemlerin önemli bir kısmını da yine tahıllar ve yan ürünleri oluşturmaktadır.

C- Besin Maddeleri Miktarlarına Göre; (88)

1-Komple (tam) yemler: Kedi ve köpeklerde yaşamlarının her dönemi için ayrı ayrı hazırlanmış olan ve günlük besin maddeleri gereksinmelerinin tamamını kapsayacak yemlerdir.

2-Tamamlayıcı yemler: Tamamlayıcı yemlerin üretilmesindeki amaç, diğer yemlerle beslemede eksik kalan besin maddelerini tamamlamaktır. Örneğin, mikser bisküviler enerji, bazı vitamin ve mineral maddeler bakımından zenginleştirilmiştir.

3-Özel amaçlı yemler (prescription): Bunlar veteriner hekim tavsiyesiyle verilmek üzere pet kliniklerinde pazarlanmaktadır.

2.11. Pet Hayvanlarında Yemlerin Hazırlanma Aşamaları ve Yem Teknolojisi

2.11.1. Mekanik İşlemler (91,92)

2.11.1.1. Kabuğun alınması (Dehulling)

Tanelerden, sert kabuklu yemişlerden ve bazı meyvelerden kabuk örtüsünün ayrılmasıdır. Tanenin değirmenden geçirilmesinde dış örtü tabakasının sıyrılarak çıkmasına kabuk temizleme, kabuk çıkarma veya cilalama denir. Tahıllardan arpa, yulaf ve pirincin kabukları çıkarılır.

2.11.1.2. Kırpma (Clipping)

Büyük çoğunlukla yulaf için uygulanan bir yöntemdir. Bu metodun esası tanelerin uçlarının kesilip uzaklaştırılarak selüloz içeriğinin düşürülmesidir.

2.11.1.3. Öğütme (Grinding)

Karma yem üretiminde ham maddelerin öğütülmesi üretimin en önemli safhasını oluşturur. Özellikle tahılların öğütülmesinde kabuk, kavus ve tanenin diğer kısımlarından ayrılması söz konusu değildir. Buna karşılık değirmencilikte taneler öğütüldükten sonra kepek ve un kısmı ayrılır.

2.11.1.4. Ezme (Rolling)

Tane yemler silindirler arasından geçirilerek düz, yassı partiküller haline getirilir.

a. Kuru ezme (Dry rolling) : Taneler oluklu yüzey üzerindeki silindirler arasında ezilir. Kabaca öğütülmüş tahıl görüntüsündedir.

b. Yaş ezme (Steam rolling) : Taneler önce buharda (1-8 dakika) tutulur ve silindirlerden geçirilir. Lezzetli olup, nem oranı ilave olarak % 6 oranında artar.

l) Ezme değirmeninin tam üstünde bulunan dikey buhar uygulama odasında atmosferik basınç altında 8-20 dk arasında buhar ön iklimlendirmesi. Bu yöntem genellikle ezmeden önce 99-102 ^{0}C' lik tane sıcaklıkları ve % 18-20'lik nem içeriğiyle sonuçlanır. Bu yöntem genellikle buhar uygulamasından sonra % 5-19, ezmeden sonra % 20-30 jelatinizasyonla sonuçlanır.

2) 20-60 psi' lik buhar basınçlarında yatay işleme ünitelerinde 50 saniye-2 dakika basınçlı ön iklimlendirme (121 ^{0}C- 149 ^{0}C). Taneler bu basınçlı pişiriciden % 20-25 jelatinizasyon ve gelen tanelerin nem içeriğine bağlı olarak % 18-25 nemle ve basınçlı pişiricide kalma süresi ayarlanmış olarak çıkar. Daha sonra tane uzun çaplı ezme değirmenlerinde ezilir ve normalde ezme değirmenlerinden geçtikten sonra % 45- % 60 oranında jelatinleşmiştir (91,92).

2.11.1.5. Buharlı sıkıştırma (Ekstrüzyon)

Ekstrüzyon işlemi çeşitli pet mamalarında ve akuatik yemlerin hazırlanmasında, beside özel madde üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yem endüstrisinde ısıl işlemin en yaygın biçimleri peletleme, kavurma, buharla pulcuk haline getirme ve ekstrüzyon/sıkıştırma' dır .

Ekstrüzyon işlemi; yemin sıkıştırılıp itildiği ve basınç altında konik deliklerden geçirildiği bir işlemdir. Ekstrüzyon birçok hammadde, değişik nem içerikleri (% 10- % 40), yem bileşenleri, pişirme sıcaklıkları (80 -200 ^{0}C) ve bekleme süreleri (10-270 saniye) için oldukça esnek bir işlemdir. Bir ekstrüder kısa süre ve yüksek sıcaklıkta birçok ham bileşeni orta dereceli ve bitirilmiş ürünlere dönüştürür. Bu işlem genellikle tanelerin öğütülmesini ve sonra yumuşatmak için ıslatılmasını, söz konusu materyalin

bir helezon vasıtasıyla çelik bir tüpten basınç altında zorlanarak geçirilmesini sağlar. Bu zorlama sırasında doğrudan friksiyon (kuru ekstrüzyon) veya kısmen buhar enjeksiyonundan (yaş ekstrüzyon) meydana gelen yüksek ısı, sistemin esasını oluşturur. Meydana gelen sürtünme sonucu 105-170 ^{0}C arasında ısı oluşur. Basınç ise 100 barlık bir değere ulaşır. Ekstrüdüre giren hammaddenin bütün bu etkilere maruz kalması birkaç saniyelik bir sürede gerçekleşir. Eksrüde materyalde bulunan nişasta yüksek oranda (% 80) jelatinleşir. Ekstrüzyondan sonra ürün kurutulmalı ve soğutulmalıdır. Ekstrüzyonla pişirilmiş ürünler kurutucu içerisinde 177-190 ^{0}C 'de 4-6 dk. süreyle besin kaybolmaksızın kurutulabilir. Bütün ekstrüzyonla pişirilmiş ürünler kurutulduktan sonra terlemenin neden olacağı bozulmayı önlemek için silo veya ambalaja konulmadan önce soğutulmalıdır (91).

2.11.2. Isı Uygulamaları

Yüksek ısı amino asitler ve vitaminler ile diğer bazı besin maddelerini tahrip eder. Uygun ısıtma ise karbonhidrat ile proteinlerden yararlanma derecesini artırır, yağların daha iyi değerlendirilmesini sağlar enerji değerini yükseltir. Mısır, arpa, sorgum gibi tahıl tanelerinin uygun şekilde ısıtılması kısmi jelatinizasyona neden olur.

2.11.2.1. Kuru ısıtma yöntemi

Bu işlem tanelerin kuru hava ile kuşatılmasıdır. Sıcaklık süratle değiştirilebilir. Kuru ısıtma yöntemlerinden başlıcaları mikronize etme, patlatma ve kavurmadır.

a. Mikronize etme (Micronizing): Kızılötesi dalgalarla tanenin kuru ısıya tabi tutulmasıdır. Isı 149 °C'ye kadar yükselir.

b. Patlatma (Popping): Kuru ısının süratli bir şekilde uygulanması tanelerin kabarıp, şişerek patlamasıdır. Havayla kurutulmuş % 10 ile % 14 arası bir nem içeriğine sahip taneler 316-371 ^{0}C'de 15-30 sn arasında ısıtılarak patlatılır. Patlatma tahılın enerji düzeyini, sindirimi ve yemden yararlanmayı arttırır.

c. Kavurma (Roasting): Taneler gaz yada elektrikle ısıtılmış kavurucudan geçirilir ve yaklaşık 149 ^{0}C'ye kadar ısıtılır ve yağlı, şişkin ve az miktarda karamelleşmiş görünümle kavrulmuş kokuya sahiptir.

2.11.2.2. Nemli ısıtma yöntemi

Tanenin etrafını su veya su buharı ile kuşatarak bir kazanda pişirmek veya basınç altında tutmaktır. Bu amaçla pişirme ve genleştirme işlemleri uygulanır.

2.11.2.3. Pulcuk haline getirme (Plaking)

Pulcuk haline getirme işlemi nişasta granüllerinin jelatinleşerek daha sindirilebilir hale gelmesini sağlar.

2.11.2.4. Peletleme (Pelleting)

Peletleme, yemlerin rutubet, sıcaklık ve basınç altında mekanik işlemle delikli kalıplardan geçirilerek birleştirilmesidir. Çap, uzunluk ve sertlik bakımından farklı ölçülerde olabilir. Pelet büyüklükleri genelde 2.5-20 mm arasında değişir. Peletleme esnasında uygulanan ısı miktarı önemlidir. Yüksek ısı uygulanırsa yemlerde bulunan protein, aminoasit ve vitaminler zarar görür (91,92).

Sonuç olarak görüldüğü gibi kedi köpek mamasının üretimi esnasında çeşitli aşamalarında yüksek ısı uygulamaları mevcuttur. Kedi köpek mamasının yapısında nişasta ihtiva etmesi sebebiyle olası Maillard reaksiyonu sonucu akrilamid oluşabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmanın amacı piyasada mevcut farklı firmalara ait 42 adet kuru kedi ve köpek yeminde akrilamid kalıntısını immunoenzimatik olarak belirlemektir. Böylece kedi ve köpek sağlığı için varsa olası bir tehdit tespit edilecek, ayrıca bu yöntemle mamalarda akrilamid düzeyi belirlenerek bu yöntemin uygulanabilirliği test edilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz, Gereç ve Kimyasallar

3.1.1. Cihaz ve Gereçler

1. EIA Spektrofotometre (BIO-TEK)
2. EIA Yıkayıcı (BIO-TEK)
3. Santrifüj
4. Vortex (Heidolph Reaxtop)
5. Hassas Terazi (Sartorius TE102S)
6. Manyetik Karıştırıcı (Elektromag-M21)
7. Çalkalayıcı (Elektromag-M21)
8. Deiyonize Su Cihazı (Millipore)
9. Etüv (Memmert)
10. Buzdolabı (Profilo)
11. Cam tüp
12. Otomatik pipet
13. Yardımcı Malzemeler

14. 100 µl ve 200 µl pipetler

15. Mutlak metanol,

16. Yıkama şişesi

17. Filtre kağıdı

18. Emici kağıt havlular

19. Zaman ölçer kronometre

3.1.2. Kimyasallar

1. Akrilamid EIA kiti (Abraxis)

    - Mikroplate 96 kuyucuklu (Antikor Kaplı)
    - Akrilamid A standart solüsyonları (0,0; 2,5;5;10;25;50 ve 200 ng/ml)
    - Akrilamid HRP Konjugat
    - Akrilamid HRP Konjugat dilüent
    - Akrilamid antikor
    - Akrilamid Substrat (color, renklendirici)
    - Akrilamid Kontrol
    - Akrilamid Sonlandırıcı (stop) solusyonu (1M Sulfirik Asit)
    - Buffer dilusyon (Yıkama Tamponu)
    - Akrilamid Derivatizasyon kiti

2. Metanol (Merck)

3. PBS buffer (Abraxis)

4. Tampon (Abraxis)

3.2. Yöntem

3.2.1. Pet Yem Numunelerinin Toplanması ve Deneye Hazırlanması

1. 22 adet farklı firmaya ait 21 kedi ve 21 köpek yemi olmak üzere toplam 42 adet pet yem, Aydın ve çevresindeki farklı pet kliniklerden temin edildi. Yem numuneleri, veteriner hekimlerle iletişime geçilerek Ocak-Nisan 2005 tarihleri arasında toplanmış ve analizleri yapılıncaya kadar uygun şartlarda muhafaza edilmiştir.

2. Alınan örnek numuneleri 2 şer gr tartılarak 5:1 oranında solvent eklendi. Çalışmada 10 ml solvent (%70'lik methanol), 2 gram numune için kullanıldı. Yapılan karışım 5 dk. hızlıca vortexte karıştırıldı.

3. Her numune için ayrı deney tüpleri uygun zemine yerleştirildi. Vortexten çıkan karışım süzüldü. Bu işlem için huni deney tüpüne yerleştirildi. Huninin içine daire şeklinde katlanmış kurutma kağıdı huninin iç çeperini tamamen kaplayacak şekilde yerleştirildi. Kağıdın üzerine bir miktar cam pamuk ve onun üzerine de bir miktar sodium sülfat eklendi ve karışım bu düzenekten süzüldü.

4. Deney tüpüne alınan süzüntülerin her biri hassas kantarda tartılarak ağırlıkları birbirine yakın olan numuneler santrifüj aletinde birbiri karşısına gelecek şekilde yerleştirilerek 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi.

5. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan kısımların her biri ayrı bir tüpe aktarıldı ve seyreltme işlemine geçildi. Seyreltme işleminde deney tüpünün üst kısmından 100µl alındı ve üzerine 900 µl methanol ilave edildi.

6. Türevlendirme işlemi
   - Örnek ekstraktından 250 µL vidalı kapaklı bir cam şişeye alındı.
   - Her bir örnek için 50 µL türetme reaktifi eklendi.
   - Kuvvetli bir şekilde 10-15 saniye vortekslendi.
   - 60 dakika süre ile 47-53 ^{0}C'de inkübe edildi. Numuneler 15 dakika soğumaya bırakıldı.

-Soğutulmuş türetilmiş örneklere 2.0 mL Akrilamid Testi Buffer Eklendi.
- Örneklerin türevlendirme ve analizleri aynı gün gerçekleştirildi.

3.2.2. EIA Analiz Yöntemi

1. Bütün ayıraçlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standart çözelti, kontrol ve türetilmiş örnekler antikor kaplı plakadaki her bir kuyucuğa 50 µl konuldu.

2. Akrilamid HRP enzim konjugat çözeltisi 50 µl konuldu.

3. Akrilamid antikor çözeltisi 50 µl eklendi. Parafinfilm veya bant ile kaplanarak yaklaşık 60 saniye boyunca masa üstü dairesel hareketlerle hareket ettirerek içerikleri karıştırıldı.

4. Plaka 4° C'da 60 dakika inkübe edildi.

5. İnkubasyondan sonra, parafilm kaldırıldı ve kuyuların içeriği boşaltıldı. Ardından yıkama tampon çözeltisi ile üç kez EIA Yıkayıcıda her bir yıkama tamponu ile (250 µl hacim olacak şekilde) yıkandı. Kuyularda kalan tampon sıvısı kağıt havlu yığını üzerinde plaka kurulanarak uzaklaştırıldı.

6. Her beyaz kutucuğa 150 µl renklendirici reagent eklenir ve oda sıcaklığında 20-30 dakika inkube edildi.

7. Her beyaz kutucuğa 100 µl Stop Solüsyon eklendi. Akrilamid içeriğine karşılık gelen optik yoğunluğun standart eğrisi oluşturuldu. Numune örnekleri standart eğrinin okunması ile ölçüldü. Numuneler en yüksek standarttan yüksek ise %70 methanol ile sulandırılıp tekrar test edildi ve sonuç belirtirken eklenmiş çözelti faktörü göz önünde bulunduruldu.

Tablo 3.1. Ticari EIA (ABRAXİS) kiti için verilen optimum deney değerleri

Doğrulama değerleri	**7,5 ng/ml**	**30 ng/ml**	**100 ng/ml**
Deneme	5	5	5
N (Çalışılan örnek)	25	25	25
Ortalama Sonuç	7,9	30.4	102,8
Geri kazanım oranı	106,1	101.2	102,8

Tablo 3.2. Kullanılan akrilamid standartları

Standart (ppb)
0,0
2,5
5
10
25
50
200

3.2.3.Değerlendirme

ELISA değerlendirilmesi (4-Parametres veya Logit/Giriş) ticari ELISA değerlendirme programları (GEN 5) kullanılarak yapıldı. Değerlendirme standartların her biri için ortalama absorbans değeri hesaplanarak yapıldı.

3.2.4. İstatistik Analiz

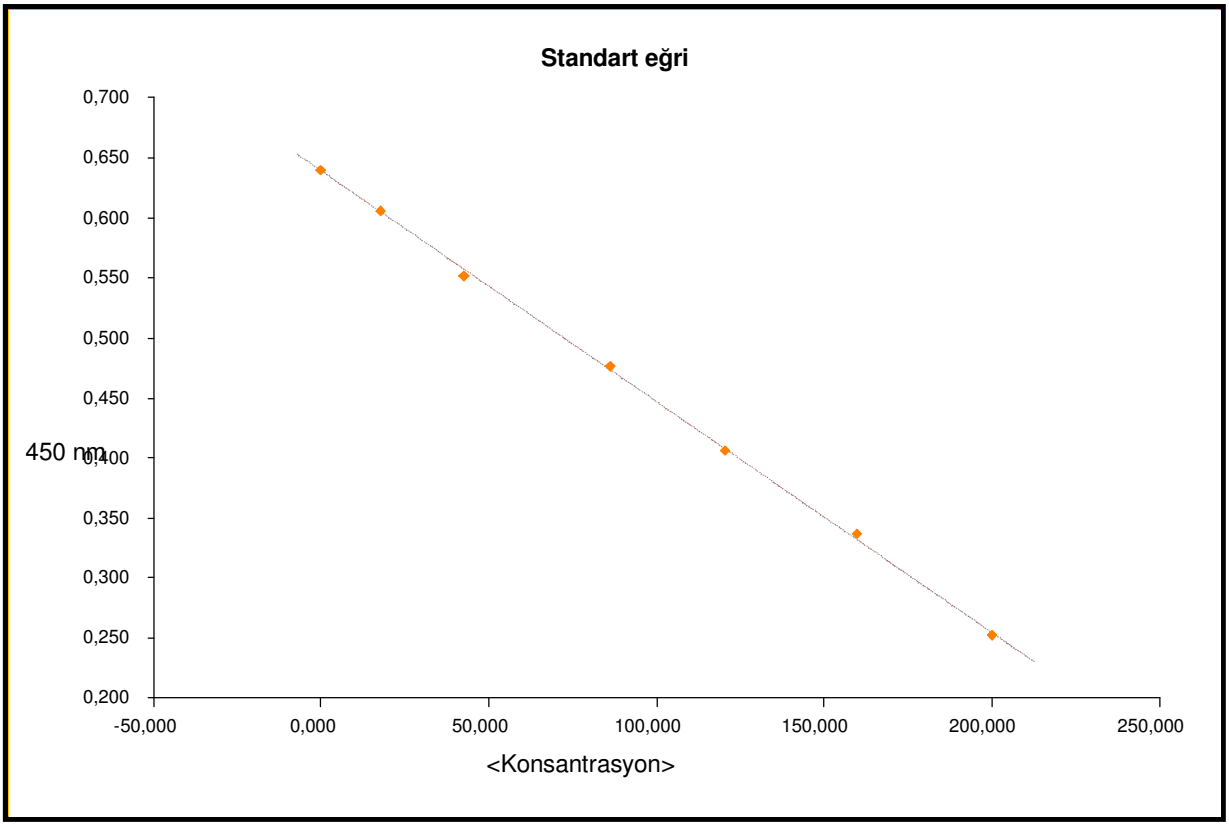
Araştırma verileri, aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde verildi. Hesaplamalar SPSS 20 Windows paket programında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Akrilamid EIA Analiz Bulguları

4.1.1. Linearity (Doğrusallık)

Linearity (doğrusallık) değeri için 7 noktalı (0-2,5-5-10-25-50 ve 200 ppb) ve EIA doğrusallık kalibrasyon grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (R2) 0.999 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1. Akrilamid Standart eğrisi).



Şekil 4.1. Akrilamid Standart eğrisi

Tablo 4.1. Pet yem örneklerindeki EIA yöntemine göre akrilamid (AKR, ppb) düzeyleri

n	**AKR (ppb)**	**n**	**AKR (ppb)**	**n**	**AKR (ppb)**
1	TED	15	TED	29	TED
2	TED	16	TED	30	TED
3	TED	17	TED	31	TED
4	TED	18	TED	32	TED
5	TED	19	**93**	33	**85**
6	**148**	20	**89**	34	TED
7	**155**	21	**96**	35	TED
8	TED	22	**45**	36	TED
9	**62**	23	TED	37	**95**
10	**85**	24	**65**	38	TED
11	TED	25	TED	39	TED
12	**55**	26	**85**	40	TED
13	**65**	27	TED	41	TED
14	TED	28	TED	42	TED

n: Pet yem örnekleri

TED: Tespit Edilemedi

Tablo 4.2. Akrilamid tespit edilen pet yem örneklerinin bulunan değerlere göre dağılım aralıkları (ppb)

Pet yem örnekleri	0-50 (ppb)	50-100 (ppb)	100-200 (ppb)
N (örnek adeti)	1	11	2

Tablo 4.3. Pet yem örneklerinde akrilamid düzeylerine ait aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri

Pet Yem	**N**	**Minimum**	**Maximum**	**Ortalama**		**Standart sapma**	**Varyans**
				Değer	Standart hata		
	14	45,00	155,00	87,3571	8,42589	31,52681	993,940

Analiz edilen örneklerin yaklaşık % 33'ünde (14 örnek) *akrilamid* varlığına rastlanmış, bu örneklerde ortalama *akrilamid* yoğunluğu 87.35 **ppb** olarak belirlenmiştir. Bulgulara göre en yüksek *akrilamid* yoğunluğu 155 **ppb**, en düşük yoğunluk ise 45 **ppb** olup, toplam örnek sayısının (n) % 67'sinde ise *akrilamid* tespit edilememiştir. Tablo 4.2'de akrilamid tespit edilen pet yem örneklerinin bulunan değerlere göre dağılım aralıkları verilmiş olup 100 ppb'nin üstünde iki örneğe rastlanmıştır. Tablo 4.3'de ise pet yem örneklerinde akrilamid düzeylerine göre aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akrilamid (AA), ticari olarak üretilen kimyasal bir üründür, nişastadan zengin gıdalarda yüksek ısılarda doğal olarak da ortaya çıkabilir. Akrilamid oluşumunda ana yol Maillard reaksiyonu olarak bilinen, aminoasit ve karbonil grubu arasında meydana gelen şeker indirgenmesidir (14,16). Akrilamid, özellikle patates cipsleri, bisküvi, ekmek, tahıl ve kahve gibi birçok yiyecek türünde mevcuttur.

Akrilamid hayvanlar ve insanlar tarafından sindirim, solunum veya deri yoluyla alınabilirler. Alındığı yola bakmaksızın akrilamid tüm dokulara hızla yayılır. Başta timus olmak üzere karaciğer, kalp, beyin, böbrekler, plasenta ve anne sütüne geçer. Akrilamid sitokrom P450'nin oksidasyonu ile glisidamid'e metabolize olur (10). Akrilamid ve glisidamid in vivo ortamda, hemoglobin, serum albuminleri, DNA ve enzimlere bağlanabilir (40,41). İnsanlarda ve hayvanlarda nörotoksik etki gösterir. Tipik bulgular arasında ataksi ve iskelet kaslarında zayıflık yer alır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) akrilamid'i 2A grubuna dahil etmiştir (5). Akrilamidin fare ve ratlarda kansere neden olduğu doğrulanmıştır. Akciğer, uterus, meme bezleri gibi birçok organda karsinojenik etkileri vardır (53,54). Çeşitli biyolojik araştırmada da genetik ve reprodüktif toksisitesi bulunduğu kanıtlanmıştır (55).

Avrupa'da yapılan çalışmalar sonucunda günlük tüketim miktarlarının yüksekliği dikkate alınarak özellikle kahve, patates ürünleri ve ekmeğin gıda kaynaklı akrilamid alımında ilk sıralarda yer aldığı görülmüştür. Konuyla ilgili ülkemizdeki gıdalarda akrilamid kontaminasyon sorununu değerlendirmek amacıyla bilhassa insan gıdalarına yönelik, özellikle çocuk mamaları, süt ve süt ürünlerinde kapsamlı araştırmalar yapılmış olup, bu çalışmada ise ilk defa hayvanlarda pet yemlerde'de bulunan akrilamid düzeyi için Türkiye'deki değişik firmalardan toplanan örneklerin test edilmesi ile değerlendirilmiştir.

Akut ya da kronik akrilamid toksisitesi ile ilgili eksperimental çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamış ve hayvanlardaki etkileri iyice anlaşılmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, köpeklerde akrilamidin oral alımını takiben oldukça hızlı ve geniş çaplı absorbsiyonu tespit edilmiştir. Sonuçta nöropati ve intoksikasyonu takiben sendromun yoğunluğu; dozun büyüklüğünden, uygulama oranından ve toksine maruz kalma süresinden bağımsızdır (65). Köpeklerde yapılan başka bir çalışmada ise akut akrilamid toksikasyonu sonucu özellikle periferal (motor ve sensorik) ve santral sinir sisteminin etkilendiği, etkinin şiddetini devam ettirebilmesi için daha yüksek dozda toksine ihtiyaç duyulacağı yazarlar tarafından rapor edilmiştir (93). Terminal dejenerasyonların primer patoloji bölgesi olduğu ve öncelikle aksonopatiye sebep olduğuna dair bilgiler veren daha güncel çalışmalar mevcuttur. Yüksek seviyelerde akut akrilamide maruz kalma sonucu, klinik görünümde tipik olarak ağrı ve ataksinin eşlik ettiği ensefalopati,

ardından nöropati tablosu ile karşılaşılmaktadır. Ayrıca bu bulgulara geniş yayılımlı otonomik disfonksiyonun eşlik ettiği tespit edilmiştir (94). Diğer hayvan türlerinden farklı olarak köpeklerde ortalama 2 ay boyunca ortalama 410 mg/kg oral olarak uygulanan akrilamid toksisitesine bağlı olarak megaözafagus tespit edilmiştir. Regurgitasyon, hastalığın son evresinde görülen en tipik klinik bulgudur. Hayvanın bulunduğu odanın zemininde, köpüklü beyaz sıvıların gözlenmesi hastalıktan şüphe edilmesine yol açan erken belirtilerdir. Daha sonra hayvanların karakteristik şekilde yedikleri gıdaları regurgite ettikleri görülür. Regurgite materyal, başlangıçta sindirilmemiş görülür ve mukus ile kaplıdır. Regurgitasyonun başlangıcını net olarak tanımlamak zordur ve akrilamid uygulamasını takiben 54-68. günlerde başladığı bildirilmektedir (62).

Kedilerde ise bu konuyla ilgili gerçekleştirilen çalışmalar, akrilamid monomerinin ölümcül dozda intravenöz uygulandığında (100 mg/kg yetişkin kedi), yoğun tonik klonik konvülziyonlar ve diğer diffüz santral sinir sistemi eksitasyonun görüldüğünü ortaya koymuştur. Ölümcül dozların altındaki dozların uygulanması, ataksi ve tremorları tetiklemektedir (64). Yetişkin erkek Beagle köpekleri ve minyatür domuzlar 1 mg akrilamid/kg/gün şeklinde 3-4 hafta beslendikleri takdirde, nörotoksik belirtiler ortaya çıkmamıştır, ama postmortem muayenede toplanan kas dokusunda akrilamid mevcuttur. Akrilamid monomeri için primer hedef sinir sistemi olmasına rağmen, bu maddenin yalnızca %1'inden azı beyinde tespit edilmiştir. Akrilamid 5 mg/kg/gün (30-60 gün periyodunda) köpek ve domuzlara uygulandığında, nöropati gözlenmiştir (65). Köpeklerin kronik olarak maruz kalması, "ataksi, zayıflık ile özellikle vagal sinir aksonopatisine bağlı megaözafagusu da içeren tipik progresif sensorimotor periferal nöropatiye yol açar (66). Ölümcül dozların altındaki doz uygulaması kesildiğinde, gelişen nöropati yavaş yavaş çözülebilir. Spastiklik ve serebellar ataksi gibi daha yoğun bozuklukların kalıcı olacağı düşünülmektedir (67,68).

Çalışmamızda; analiz edilen örneklerin yaklaşık %33'ünde (14 örnek) *akrilamid* varlığına rastlanmış, bu örneklerde ortalama *akrilamid* yoğunluğu 87.35 **ppb** olarak belirlenmiştir. Bulgulara göre en yüksek *akrilamid* yoğunluğu 155 **ppb**, en düşük yoğunluk ise 45 **ppb** olup, toplam örnek sayısının (n) % 67'sinde ise *akrilamid* tespit edilememiştir. Her ne kadar çalışmada tespit edilen sınırlar normal akut toksikasyon

riski oluşturmasa da üretim aşamalarında yüksek sıcaklık uygulanan yemlerin sürekli olarak alınması kedi ve köpeklerde kronik toksisite riski oluşturabilir. Özellikle nörolojik bozukluk gösteren kedi ve köpeklerde akrilamid toksisitesi de göz önünde bulundurulmalıdır. Zira bu konuda oldukça az literatür bilgi mevcuttur. Bir klinik raporda (63) ise sağlıklı üç Labrador yavrusu yanık mısır lapası yedikten kısa bir süre sonra ataksi, hipermetri ve konvülziyon geliştiği bildirilmiştir. Zehirlenme belirtisi görülen üç yavrunun yüksek sıcaklıkta hazırlanan nişasta bazlı besin maddelerini yedikten sonra sinirsel semptomların bulunması akrilamid toksisitesini düşündürmüştür. Bunu takiben iki yavrunun ölmesi ise durumun ciddiyetini artırmış ve ölümlerin özellikle distal aksonopatiden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Mısır unundan hazırlanan lapa, Güney Afrika'daki insanlar için başlıca diyettir ve yanık kalıntıları ile sıklıkla pet hayvanları beslenmektedir. Bu hayvanlarda meydana gelecek akrilamid toksisitesi olasılığı, özellikle genç hayvanlarda, nörolojik belirtiler görüldükten sonra üzerinde dikkatle düşünülmesi gereken bir konudur. Konuyla ilgili klinik raporların azlığı konunun gözden kaçırılmasına neden olsa da özellikle nişastadan zengin yüksek ısıya maruz kalmış gıdalarla beslenen ve nörolojik bozukluk gösteren kedi ve köpeklerin akrilamid toksikasyonu yönünden de incelenmesi gereğini ortaya koymaktadır.

Köpek ve kedi mamalarının AA konsantrasyonları ile ilgili araştırma yapıldığında konu ile ilgili oldukça az kaynak olduğu gözlenmektedir. Veselá ve Šucman (96) voltametrik yöntemle çeşitli firmalara ait kuru köpek ve kedi mamasında akrilamid düzeyine bakmışlardır. Yazarlar metodun doğruluğunu test etmek içinse kontrol grubu galeta ve gevrek ekmek kullanılmışlardır. Sonuç olarak voltametrik yöntemle hesaplanan bu çalışmada, köpek mamalarında akrilamid düzeyi 106 ile 358 µg/kg, kedi mamalarında ise 66 ile 269 µg/kg arasında bulunmuştur. Ölçülen ve hesaplanan akrilamid düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmuştur. Bizim çalışmamızda immunoenzimatik yöntemle akrilamid tayini yapılmış ve voltametrik yöntemle kedi köpek yemlerinde yapılan çalışmaya benzer sonuçlar bulunmuştur. Ölçülen akrilamid düzeyi kedi ve köpek mamalarında 45-155 ppb aralığında tespit edilmiştir.

Akrilamid tayininde gaz kromatografi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve kapillar elektroforezis (CE) kullanılmıştır. Ayrıca kedi ve köpek

mamalarında ise akrilamid tayinine ilişkin aynı yazarlar tarafından benzer yöntemlerle sadece 2 adet yayına rastlanılmıştır. Bu çalışmaların ikisinde de voltametrik olarak akrilamid düzeylerine bakılmış ve benzer sonuçlar rapor edilmiştir (95,96). Yazarlar kuru kedi ve köpek mamalarında akrilamid tayininde voltametrik yöntemlerin kullanımı güvenilir, hassas, hızlı ve düşük maliyetli olduğunu; ayrıca ekstraksiyon ve ölçümlerin değerlendirilmesi dahil analiz için harcanan toplam süre yaklaşık olarak 2 saat olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada immunoenzimatik olarak kedi ve köpek mamasında akrilamid düzeyi tespit edilmiştir. Bu yöntem, Voltametrik metoda göre daha az ekipmana ihtiyaç duyulması, daha ucuz, hassasiyet ve birkaç saat gibi kısa zamana ihtiyaç göstermesi gibi nedenlerden dolayı tercih edilebilir.

Türk Gıda Kodeksinin **(Tebliğ No: 2005/31)** Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde (71) verilen SML=ND (DL=0.01 mg/kg) değerleri gereğince, akrilamidin Spesifik Migrasyon Limiti (SML) tespit edilemeyene eşit (ND) olarak verilmiş ve (DL) analiz metodunun tespit limiti 0,01 mg/kg olarak belirlenmiştir. Spesifik Migrasyon limiti, gıdalara temas eden plastik madde veya malzemelerden, gıdaya geçebilen akrilamid'in en yüksek yasal seviyesi olarak tanımlanmaktadır. Buna göre çalışmada elde ettiğimiz bulgularımızla karşılaştırıldığında, bulunan sonuçlar söz konusu değerin altındadır.

Gıdalarda akrilamid düzeyleri ile ilgili henüz ne Avrupa Birliği ne de ülkemizde belirlenmiş resmi limit değerleri bulunmamaktadır. Fakat Avrupa Komisyonu (EC), Avrupa Gıda Güvenliği Dairesi (EFSA)'nin 2007-2008 yılları arasında gerçekleştirdiği **'Gıdalarda Akrilamid İzleme Programı'** verilerinden yola çıkarak çok tüketilen bazı gıdalar için **'Gösterge Değerler'** adı altında bir liste yayınlamıştır (72). **'Gösterge Değerler'** akrilamid için maksimum limit değerleri olmayıp, yetkili merciye bu değerler aşıldığı zaman sorunun nerde olduğuna dair yardımcı olacak bir rehber niteliğindedir. Bu çalışmada da sonuçlar **'Gösterge Değerler'** listesine göre yorumlanmştır (Tablo 2.5). Bulgularda belirlenen *akrilamid* değerlerinin, Avrupa Gıda Güvenliği Dairesi (EFSA)'nin gıda gösterge değerlerinin oldukça altında olduğunu göstermektedir. İnsan gıdalarıyla karşılaştırıldığında sonuç toksisite sınırının oldukça altında bulunmuştur.

Akrilamidin insanlar üzerindeki karsinojenik etkisinin sayısal olarak ifadesi için yeterli düzeyde epidemiyolojik verinin bulunmaması, kesin ve güvenilir bir değerlendirme

yapılmasını ve net bir sonuca ulaşılmasını olanaksız hale getirmektedir. Risk değerlendirme komiteleri, akrilamid riskinin devam etmekte olan karsinojenite ve uzun-dönemli nörotoksisite çalışmaları ışığında tekrar değerlendirilmesini ve gıdalarda akrilamid oluşumunun azaltılmasına yönelik çalışmaların devam ettirilmesini tavsiye etmektedirler (97). Türkiye açısından değerlendirildiğinde ise resmi makamlar tarafından bu konuya yönelik yapılmış herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Bu, ülkemizde yaşayan bireylere yönelik bir risk değerlendirmesinin henüz yapılmadığı anlamına gelmektedir. TÜBİTAK bünyesinde akrilamid analizlerine yönelik çalışmalar yapılmakla birlikte bilindiği kadarıyla akrilamid kaynaklı risklere yönelik bir rapor yayınlanmamıştır. Akrilamidin insan sağlığı üzerine etkileri yukarıda belirtildiği gibi tam olarak açığa çıkarılmamışken hayvanlar üzerine olası etkileri tamamen belirsizdir. Kaldı ki konuyla ilgili hiç yurt içi kaynağa veya rapora rastlanılmamıştır. Yine de potansiyel karsinojenik bir madde olan akrilamidin yemlerde varlığı bir gerçektir. Bu nedenle akrilamid konsantrasyon düzeyinin tüm hayvansal yemlerde belirli aralıklarla alınan numunelerden tespit edilerek sürekli gözlem altında tutulmalıdır.

Sonuç olarak bu özgün çalışmada ilk defa akrilamid varlığı kuru kedi ve köpek mamalarında ortaya konmuştur. İmmunoenzimatik yöntemle tespit edilen akrilamid, kedi ve köpeklerin sağlığını etkileyecek düzeylerin altında bulunmuştur. Bu da daha önce sadece voltametrik yöntemle tespit edilmiş akrilamid düzeylerine paralellik göstermiştir ve alternatif bir yöntem olabileceği kanısına varılmıştır. Immunoenzimatik metodun kedi ve köpek mamalarında standart bir teknik olarak kullanılabilmesi için bundan sonra daha geniş çaplı araştırmalar tarafından desteklenmesi gerekmektedir. Yine koruyucu olarak gıdalarını seçme şansı bulunmayan pet hayvanlarının yemlerinin hazırlanması esnasında akrilamid oluşumuna neden olan Maillard reaksiyonunu sınırlandırmak için formülasyonun ve proses parametrelerinin değiştirilmesi, özellikle ekstrüzyon ve diğer ısı gerektiren işlemlerin özenle yapılması önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Carpenter EL, Davis HS. Acrylamide-Its preparation and properties. J Appl Chem 1957; 7: 671-672.

2. Bayer O. Die Chemie des Acrylnitrils. Angew Chem 1949; 61 (6): 229-241.

3. Calvin E. Vinyl and related polymers. J Polym Sci 1952; 9 (6): 594-594.

4. Karagöz A. Akrilamid ve Gıdalarda Bulunuşu. TAF Preventine Medicine Bulletin 2009; 8 (2): 187-192.

5. International Agency for Research on Cancer (IARC); IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Industrial Chemicals, Geneva, Switzerland. 1997; 60; p 389-433.

6. Amrein T. Systematic Studies on Process Optimization to Minimize Acrylamide Contends in Food. Doctoral Thesis. Swiss Federal Insttitue of Technology, Natural Science 2005: 160.

7. Eriksson S. Acrylamide in Food Products: Identification, Formation and Analytical Methodology. Doctoral Thesis, Stockholm University, Department of Environmental Chemistry 2005: 91.

8. Grivas S, Jagerstad M, Lingnert H, Skog K, Tornqvist M, Aman P. Acrylamid in food mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. Sweden: Swedish National Food Administration, 2002.

9. Ötles S, Ötles S. Acrylamide in Foods Chemical Structure of Acrylamide. The Turkish Journal of Toxicology 2004; 2 (3): 19-25.

10. Tyl R, Crump K. Acrylamide in Food. Food Standards Agency 2003; 5: 215-222

11. Gertz C, Klostermann S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. European Journal of Lipid Science and Technology 2001; 104: 762–771.

12. Lingnert H, Grivas S, Jaegerstad M, Skog K, Törnqvist M, Aman P. Acrylamide in food: Mechanisms of formation and influencing factors during heating foods. Scandinavian Journal of Nutrition 2002; 46(4): 159-172.

13. Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman S. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. J Agric Food Chem 2003; 51: 802-808.

14. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature 2002; 419 (3): 448-449.

15. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GR, Villagran MD. Acrylamide formation mechanism in heated foods. J Agric Food Chem 2003; 51: 4782-4787.

16. Frıedman M. Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamide. A Review. J Agric Food Chem 2003; 51 (16): 4504-4526.

17. Yaylayan VA, Wnorowski A, Perez-Locas C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. J Agric Food Chem 2003; 51: 1753-1757.

18. Stadler RH, Blank I,Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC ve Riediker S. Acrylamide from Maillard Reaction Products. Food Chem 2002; 419: 449- 450.

19. Amrein TM, Limacher A, Conde-Petit B, Amadò R, Escher F. Influence of thermal processing conditions on acrylamide generation and browning in a potato model system. J Agric Food Chem 2006;54 (16): 5910–5916.

20. Granvogl M, Jezussek M, Koehler P, Schieberle P. Quantification of 3-amminopropionammide in potatoes: a minor but potent precursor in acrylamide formation. J Agric Food Chem 2004; 52: 4751-4757.

21. Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T. Cromatographic investigation on acrylamide formation in browning model systems. J Agric Food Chem 2003; 51: 3999-4003.

22. Biedermann M, Biedermann-Brem S, Noti A, Grob K. Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 2002; 93: 653-667.

23. Chuda Y, Ono H, Yada H, Ohara-Takada A, Matsuura-Endo C, Mori M. Effects of Physiological Changes in Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.) after Low Temperature Storage on the Level of Acrylamide Formed in Potato Chips. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67: 1188-1190.

24. Leufvén A, Lingnert H. Factors influencing acrylamide formation in food processing—Introductory model experiments performed at SIK. Public report of the Swedish Institute for Food and Biotechnology, 2003.

25. Dembinski E, Bany S. The amino acid pool of high and low protein rye inbred lines (Secale cereale L.). Journal of Plant Physiology 1991; 138: 494-496.

26. Surdyk N, et al. Effects of asparagine, fructose and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. J Agric Food Chem 2004; 52(7): 2047-2051.

27. Springer M, Fischer T, Lehrack A, Freund W. Acrylamidbildung in Backwaren. Getreide Mehl und Brot 2003; 57: 274-278.

28. Claeys WL, Vleeschouwer KD, Hendrickx ME. Quantifing The Formation of Carcinogens During Food Processing: Acrylamide. Trends in Food Science and Technology 2005; 16: 181-193.

29. Jung MY, Choi DS, Ju JW. A Novel Technique for Limitation of Acrylamide Formation in Fried and Baked Corn Chips and in French Fries Journal of Food Science. J Food Sci 2003; 68: 1287-1290.

30. Eichner K, Karel M. The Influence of Water Content and Water Activity on the Sugar-Amino Browning Reaction Model Systems under Various Conditions. Food Chem 1972; 20: 218-223.

31. Brathen E, Kita A, Knutsen SH, Wicklund T. Addition of Glycine Reduces the Content of Acrylamide in Cereal and Potato Products. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2005; 53: 3259-3264.

32. Summa C, Wenzl T, Brohee M, De La Calle B, Anklam E. Investigation of the correlation of the acrylamide content and the antioxidant activity of model cookies. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006; 54: 853-859.

33. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J Agric Food Chem 2002; 50 (17): 4998-5006

34. Gökmen V, Palazoğlu TK, Şenyuva HZ. Relation between the Acrylamide Formation and Time-Temperature History of Surface and Core Regions of French Fries. Journal of Food Engineering 2006; 77: 972-976.

35. Noti A, Biedermann-Brem S, Biedermann M, Grob K, Albisser P, Realini P. Storage of potatoes at low temperature should avoided to prevent increased acrylamide formation during frying or roasting. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 2003; 94: 167-180.

36. Olsson K, Svensson R, Roslund CA. Tuber components affecting acrylamide formation and colour in fried potato: variation by variety, year, storage temperature and storage time. Journal of the Science of Food and Agriculture 2004; 84: 447-458.

37. U.S.Environmental Protection Agency (US EPA), Health and Environmental Effects Profile for Acrylamide. Office of Research and Development, U.S.EPA Washington, D.C. 1985: p 95.

38. Marlowe C, Clark M. The distribution of (^{14}C) acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. Toxicol Appl Pharmacol 1986; 86: 457-465.

39. Carlson G, Weaver P. Distribution and binding of (^{14}C) acrylamide to macromolecules in SENCAR and BALB\c mice following oral and topical administration. Toxicol Appl Pharmacol 1985; 79: 307-313.

40. Bergmark E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. Chem Res Toxicol 1997; 10: 78-84.

41. Bergmark E, Calleman CJ, He F, Costa LG. Hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. Toxicol Appl Pharmacol 1993; 120: 45-54.

42. Sumner SCJ, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzales F, Ghanayem BA. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. Chem Res Toxicol 1999; 12: 1110-1116.

43. Ghanayem BI, Witt KL, El- Hadri L, Hoffler U, Kissling GE, Shelby MD, Bishop JB. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrilamide: Evidence supporting a glycidamide-mediated effect. Biol Reprod 2005; 72: 157-163.

44. Barber DS, Hunt JR, Ehrich MF, Lehning EJ, LoPachin RM. Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. NeuroTox 2001; 22: 341-353.

45. World Health Organisation (WHO), Acrylamide Enviromental Health Criteria 49, Geneva 1985.

46. Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fischer-344 rats. Toxicol and Appl Pharm 1982; 63: 36-44.

47. Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Schömig, E. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2006; 15(2): 266-271.

48. Paulsson B, Grawe S, Tornqvıst M. Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or Nmethylolacrylamide treatment. Mutation Res 2002; 516:101-111.

49. Anonim, 2002. European Commision "Opinion of the Scientific Committee on New Findings Regarding the Presence of Acrylamide in Food".Belgium, 2002: p 16.

50. Petersen B. Acrylamide: Formation, Exposure, Possible Reduction Strategies, Presentations at the US FDA Food Advisory Committee Meetings (Aralık 2002)

51. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman S. Acrylamide in foods: occurrence, source. Annual Meeting, s 22-26, 2002, Los Angeles CA, AOAC.

52. Erdreich LS, Friedman MA. Epidemiologic evidence for assessing the carcinogenicity of acrylamide. Regulatory Toxicology and Pharmacology (in pres), 2004.

53. Ruden C. Acrylamıde and cancer risk-expert risk assessments and the public debate. Food Chemist Toxicol 2004; 42: 335-349.

54. Mucci L, Dickman P, Steineck G, Adami H, Augustsson K. 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 2003; 88: 84-89.

55. Sharp D. Acrylamide in Food. The Lancet 2003; 361(9355): 361-362.

56. Wilson KM, Rimm EB, Thompson KM, Mucci LA. Dietary Acrylamide and Cancer Risk in Humans: A Review. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2006; 1 (1): 9-27.

57. He FS, Zhang SL, Wang HL, Li G, Zhang ZM, Li FL, Dong XM, Hu FR. Neurological and electroneuromyographic assesment of the adverse effects ofacrylamide on occupational exposed workers. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health 1989; 15: 125-129.

58. Calleman CJ, Bergmark E, Stern LG, Costa, IGA. Nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide, Environmental Health Perspectives 1993; 99: 221-223.

59. Costa LG. Biomarker research in neurotoxicology; the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. Environmental Health Perspectives 1996; 104: 55-67.

60. Gerrard JA. 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 2006; 17: 324-330.

61. Rice JM. The carcinogenicity of acrylamide. Mutation Research 2005; 580: 3-20.

62. Satchell PM, Mcleod JG. Megasesphagus due to acrylamide neuropathy. Journal of Neurosurgery and Psychiatry 1981; 44: 906-913.

63. Le Roux-Pullen L, Lessing D. Should veterinarians consider acrylamide that potentially occurs in starch-rich foodstuffs as a neurotoxin in dogs? Journal of the South African Veterinary Association 2011; 82(2): 129-130.

64. Kuperman AS. Effects of acrylamide on the central nervous system of the cat. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1958;123: 182-192.

65. Ikeda GJ, Miller E, Sapienza PP, Michel TC, Inskeep PB. Comparative tissue distribution and excretion of [1–^{14}C]acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. Food and Chemical Toxicology 1987;25: 871-875.

66. Strombeck RR, Troya L. Evaluation of lower motor neuron function in two dogs with megaoesophagus. J Am Vet Med Assoc 1976;169:411-4.

67. Mathias CJ. Disorders of the autonomic nervous system. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. (eds.) Neurology in clinical practice. volume 2. The neurological disorders. Butterworth Heinemann: Oxford, 2004: p 2403-2439.

68. Murray L. Center of Clinical Toxicology, Nashville 1999, Acrylamide. Online at: http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652 (28.01.2014).

69. Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, Törnqvist M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. J Agric Food Chem 2003; 51: 7012-7018.

70. Releases new data on acrylamide levels in food and final action plan. FDA. 2004. http://www.ifst.org/site/cms/contentviewarticle.asp?article=545. (03.10.2012).

71. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi (Tebliğ No: 2005/31) Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler.

72. 2014, http://www.food.gov.uk/science/acrylamide/#.U3D9VIF_sud, (06.09.2014).

73. Zhou X, Fan LY, Zhang W, Cao CX. Separation and determination of acrylamide in potato chips by micellar electrokinetic capillary chromatography. Talanta 2007a; 71: 1541-1545.

74. Gianni S, Armando F, Gabriella M, Massimo R, Sauro V, Sergio A. HPLC–MS validation of QualisaFood biosensor kit for cost-effective control of acrylamide levels in Italian coffee, Food Control 2007; 18: 1267-1271.

75. Alpözen E, Güven G, Üren A. Akrilamid analiz yöntemleri, Kromatografi Kongresi, s 59, 7-10 Eylül 2011, Diyarbakır.

76. Pedreschi F, Segtnan VH, Knutsen SH. On-line monitoring of fat, dry matter and acrylamide contents in potato chips using near infrared interactance and visual reflectance imaging, Food Chemistry 2010; 121:616-620.

77. Quan Y, Chen M, Zhan Y, Zhang G. Development of an enhanced chemiluminescence ELISA for the rapid detection of acrylamide in food products, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011; 59: 6895-6899.

78. Stadler RH. Understanding the formation of acrylamide and other Maillard-derived vinylogous compounds in foods. Eur J Lipid Sci Technol 2003; 105: 199-200.
79. Wenzl T, Beatriz de la Calle M, Anklam E. Analitical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. Food Additives and Contaminants 2003; 20 (10) : 885-902.
80. Honicke K, Gatermann R, Harder W, Hartig L. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 2004; 520: 207-215.
81. Pittet A, Perisset A, Oberson J. Trace level determination of acrylamide cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 2004; 1035: 123-130.
82. Zhang Y, Dong Y, Ren Y, Zhang Y. Rapid determination of acrylamide contaminat in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. Journal of Chromatography A 2006; 1116(1): 209-216.
83. Hilton JW. Nutrition Requirements of Cats and Dogs. Pets Foods & Feeding.Feed Industry Red Book.Eden Prairie, Minesota 1996.
84. Edney ATB. Dog and Cat Nutrition. Pergamon Pres, 1992.
85. Ergün A. Köpek ve Kedide Besin Maddeleri Greksinimleri, In: Köpek ve Kedi Besleme, Beslenme Hastalıkları Ve Klinik Besleme, Ergün A. ve Muğlalı H. Ankara,1998: p 31-32.
86. Briggs GM. Nutrition and Management of Dogs and Cats, Ralston Purina Company, St.Louis, Missouri,1987.
87. Kahraman R. Kedi ve Köpeklerin Beslenmesi ve Beslenme Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 2007; İstanbul.
88. Ergün A. Köpek ve Kedi Yemleri, In: Köpek ve Kedi Besleme, Beslenme Hastalıkları Ve Klinik Besleme, Ergün A. ve Muğlalı H. Ankara, 1998: p 121-135.
89. Çalışkaner Ş. Köpek Beslemenin Bilimsel Esasları ve Pratik Öneriler. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1992: p 1259.

90. Wılls JM, Sımpson KW. The Waltham Book of Clinical Nutrition of The Dog and Cat, Waltham Centre for Pet Nutrition, A Division of Mars GB Ltd., 1994; Pergamon Press.

91. Yıldız G. Yem Teknolojisi, In: Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi, Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ,Yalın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A, Saçaklı P. Pozitif, Genişletilmiş 5.Baskı, Ankara 2013: p 317-340.

92. Ergül M. Karma Yemler ve Karma Yem Teknolojisi (2.baskı), Ege Üniv. Zir. Fak. Yayın No: 384, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 1994.

93. Pulley MT. 1999 Acrylamide neuropathy. Online at: http://www.medlink.com/ medlinkcontent.asp (28 January 2011).

94. LoPachin RM. The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: mechanism or epiphenomenon? NeuroToxicology 2002; 23: 253-257.

95. Veselá H, Šucman E. Determination of acrylamide in food using adsorption stripping voltammetry. Czech J. Food Sci 2013; 31: 401-406.

96. Veselá H, Šucman E. Determination of acrylamide in dry feedstuff for dogs and cats. Acta Veterinaria Brno 2013; 82: 203-208.

97. JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, JECFA/64/SC, World Health Organization WHO, Rome, Italy, 2005; 7-17.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nimet KILIÇ
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 22 Temmuz 1979, Kayseri
Medeni Durumu: Evli
Tel: +90 256-212 53 14
Fax: +90 256-214 80 41
Email: nimet.kilic@adu.edu.tr
Yazışma Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Gençlik Caddesi No:7 Efeler / AYDIN 09100

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2000

Lise	Behice Yazgan Kız Lisesi, Kayseri	1996

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2004- Halen	Adnan Menderes Üniversitesi Aydın Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce