

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ashhan BÜĞÜLÜ

**AKRİLAMİD, 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL VE 4-
METİLİMİDAZOLÜN BAZI BAKTERİLER ÜZERİNE
İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA,2020

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKRİLAMİD, 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL VE 4-METİLİMİDAZOLÜN BAZI BAKTERİLER ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslıhan BÜĞÜLÜ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr.M. Ümit ÜNAL
Yıl:2020, Sayfa sayısı:75
Jüri :Prof.Dr.M.Ümit ÜNAL
: Prof.Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Dr.Öğr.Üyesi Ali Emrah ÇETİN

Bu çalışmada 5-hidroksimetil-2-furfural (5-HMF), akrilamid ve 4-metilimidazolün *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* bakterilerine karşı inhibisyon etkisi disk difüzyon ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) yöntemleriyle incelenmiştir. Kullanılan kimyasallar saf hâlde satın alınmıştır. Disk difüzyon yönteminde amfisilin, kloramfenikol ve streptomisin antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Antibiyotik disklerinin inhibisyon etkisi 5-HMF, akrilamid ve 4-metilimidazolün kullanılan konsantrasyonlarının neden olduğu inhibisyon değerinden yüksek bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemine göre kullanılan kimyasalların *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Yersinia* sp. üzerine inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Akrilamid bakterilerin hiçbirinde inhibisyona neden olmamıştır. MİK değerleri kullanılan kimyasallar için çalışılan tüm bakterilerde belirlenebilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 5-Hidroksimetilfurfural, akrilamid, 4-metilimidazol, inhibisyon, bakteri

ABSTRACT

MSc. THESIS

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT OF ACRILAMID, 5-HYDROXIMETHFURFURAL AND 4-METHYLIMIDAZOLE ON SOME BACTERIA

Ashhan BÜĞÜLÜ

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr.M. Ümit ÜNAL
Year:2020, Page:75
Jury : Prof.Dr.M.Ümit ÜNAL
: Prof.Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Asts. Prof. Dr.Ali Emrah ÇETİN

This study was undertaken to investigate antimicrobial effect of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), acrylamide and 4-methylimidazole on *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* by disc diffusion and Minimum Inhibition Concentration (MIC) methods. The chemicals used were purchased in pure form. In the disc diffusion method, ampicillin, chloramphenicol and streptomycin antibiotic discs were used. The inhibition of antibiotic discs was found to be higher than the inhibition value caused by the concentrations of 5-HMF, acrylamide and 4-methylimidazole. According to the disk diffusion method inhibition was not observed for *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Yersinia* sp bacteria. MIC values could be determined for all bacteria.

Keywords: 5-Hydroxymethylfurfural, acrylamide, 4-methylimidazole, inhibition, bacteria

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Dünyada artan nüfusun güvenilir gıda talebini karşılayabilmek, gıdanın bozulmadan ve güvenli bir şekilde insan beslenmesinde kullanılmasını sağlamak amacıyla ürünlere doğru işlemler uygulanmalı ve gıdalar uygun koşullarda muhafaza edilmelidir. Gıdaların daha uzun süre dayandırılması amacıyla uygulanan işlemlerden biri ısıtma işlemidir. Bu işlemle mikroorganizmaların gelişimi önlenir, istenmeyen enzimler inaktive edilebilir veya gıdaların duyu özellikleri, lezzet, renk, tat, aroma ve doku çeşitliliği geliştirilebilir. Bu amaçla gıdalara, pişirme, kızartma, ekstrüzyonla pişirme, pastörizasyon veya sterilizasyon vb. gibi ısıtma işlemleri uygulanmaktadır. Uygulanan bu işlemler gıdaların dayanma süresinin artırılmasıyla birlikte istenmeyen birçok mutajenik ve kanserojenik bileşiğin oluşmasına da sebep olabilmektedir.

Isıtma işlemi sonucu oluşabilen bileşiklerden olan 5-hidroksimetil-2-furfural, akrilamid ve 4-metilimidazol çalışmamızda inhibisyon etkisi araştırılan bileşiklerdir. Bu bileşikler temel olarak Maillard reaksiyonu yoluyla oluşmaktadır. Diyet ile sıklıkla tüketilen gıdalarda (ekmek, patates kızartması ve cipsi, bal, bisküvi, cola) yüksek miktarda bulunabileceğini gösteren yayınlar mevcuttur.

5-Hidroksimetil-2-furfural (5-HMF) oluşumu heksoz parçalanması (karamelizasyon) ve Maillard reaksiyonunda ortak ara ürün olan 3-deoksizon üzerinden meydana gelmektedir. Reaksiyon asidik ortamda enelizasyon ile başlayarak enediol denen önemli bir ara ürünü oluşturmasıyla devam etmektedir.

Akrilamid oluşumu için temel yol Maillard yolu olarak önerilmektedir. Akrolein ve 3-aminopropionamid üzerinden oluşum yolları da mevcuttur. Akrilamid oluşumu için serbest asparajin, serbest indirgen şeker, yüksek sıcaklık (>120°C), gıdanın yüzeyindeki düşük nem gibi koşullar gerekmektedir.

4-metilimidazolün gıdalarda oluşumu hakkında yeterli ve kesin bilgi bulunmamaktadır. 4-MeI oluşum mekanizması büyük olasılıkla, reaktif karbonil

(glikoz, früktoz ve maltoz, vb.) ve dikarbonil bileşikleri ile amino asitler (veya amonyak bileşikleri) arasındaki Maillard reaksiyonundan kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), akrilamid ve 4-metilimidazolün *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* bakterilerine karşı inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Deneyler disk difüzyon ve minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Disk difüzyon yönteminde amfisilin, kloramfenikol ve streptomisin antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre;

Lactobacillus rhamnosus, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Yersinia* sp. üzerine çalışılan kimyasallar disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon etkiye neden olmamıştır. Akrilamid araştırılan bakterilerde disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon etkiye neden olmamıştır. 5-HMF *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 'ye 0,05 g/mL ve 0,025 g/mL; *Klebsiella* sp.'ye yalnızca 0,05 g/mL konsantrasyonunda inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Antibiyotik disklerinin inhibisyon etkisi 5-HMF, akrilamid ve 4-metilimidazolün kullanılan konsantrasyonlarından yüksek bulunmuştur.

4-MeI'ün disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon etki gösterdiği bakteriler *Pantoea* sp., *Enterococcus faecalis*, *Proteus* sp.'dir.

Çalışılan bakterilerden *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus plantarum* streptomisine direnç göstermiştir. *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp. amfisiline direnç göstermiştir. Kloramfenikolün inhibisyon etkisi çalışılan tüm bakterilere karşı gözlenmiştir.

Minimum inhibe edici konsantrasyon yönteminde elde edilen bulgulara göre, tüm bakterilerde çalışılan kimyasallar için farklı konsantrasyonlarda inhibisyon etki belirlenebilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösterip katkı sunan, bana örnek olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL'a,

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren hocalarım Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya ve Dr.Öğr.Üyesi Ali Emrah ÇETİN'e,

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Aysun ŞENER GEDÜK'e, deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Sadık DİNÇER'e, Arş.Gör.Gözde KONURAY'a ve Arş.Gör.Bilal AĞIRMAN'a,

Maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Nilgün BÜĞÜLÜ ve babam Erdem BÜĞÜLÜ'ye, kardeşlerim Yaren ve Kerem'e, seçtiğim aile bireyim Özge BÜYÜKULUSOY'ave ailemin diğer tüm fertlerine sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Maillard Reaksiyonu.....	6
2.2. Akrilamid.....	12
2.2.1. Akrilamid Oluşum Mekanizması	12
2.2.2. Akrilamid ve Gıda.....	17
2.2.3. Akrilamid ve Sağlık	19
2.2.4.Akrilamid ve Metabolizması.....	21
2.3.5-Hidroksimetil-2-Furfural (5-HMF).....	23
2.3.1.5-Hidroksimetil-2-Furfural (5-HMF) Oluşum Mekanizması.....	24
2.3.2. 5-HMF ve Gıda	26
2.3.3. 5-HMF’ nin Metabolizması.....	29
2.3.4. 5-HMF ‘nin Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri	30
2.4.4-Metilimidazol (4-MeI).....	32
2.4.1. 4-Metilimidazol (4-MeI) Oluşum Mekanizması	33
2.4.2. 4-Metilimidazol’ ün Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri	37
2.4.3.4-Metilimidazol ve Gıda	38
2.4.4.4-Metilimidazol ve Metabolizması	40
3.MATERYAL VE METOT	43

3.1. Materyal	43
3.2. Metot	43
3.2.1. 5- Hidroksimetilfurfural (5-HMF), Akrilamid ve 4-(5) Metilimidazolün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	43
3.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi	43
3.2.3. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon Yöntemi	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Disk Difüzyon Yöntemi İle Bakteriler Üzerine İnhibisyon Etkinin İncelenmesi	48
4.2. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (Mik) Yöntemi İle İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Farklı gıdalarda akrilamid seviyeleri ($\mu\text{g/kg}$) ^a	19
Çizelge 2.2. Çeşitli gıdalarda 5-HMF seviyeleri	28
Çizelge 2.3. Endüstri tarafından sağlanan verilere göre karamel sınıf I, II, III ve IV'te ısı türevi bileşenlerin oluşumu	39
Çizelge 4.1. 5-HMF ve 4-MeI'ün bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları.....	49
Çizelge 4.2. Kullanılan antibiyotik disklerin inhibisyon zonları	50
Çizelge 4.3. Bakterilerde ölçülen MİK değerleri.....	58



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Maillard Reaksiyonu.....	11
Şekil 2.2. Maillard Reaksiyonu ve Akrilamid Oluşumu.....	16
Şekil 2.3. 5-HMF'nin oluşumu ve Amadori-yeniden düzenlenmesi.....	25
Şekil 2.4. Metilglisokalden 4-metilimidazolün önerilen oluşum mekanizmaları	34
Şekil 4.1. <i>Yersinia</i> sp. bakterisinde amfisilin, kloramfenikol, streptomisin neden olduğu zonlar.....	53
Şekil 4.2. <i>Escherichia coli</i> ’ de 0,025 g/mL 5-HMF konsantrasyonunda gözlemlenen inhibisyon zonu	56
Şekil 4.3. 4-MeI’ün <i>Lactobacillus rhamnosus</i> bakterisine inhibisyon etkisi.....	59
Şekil 4.4. Akrilamidin <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterisine inhibisyon etkisi	60



SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	:Mikrogram
3- APA	: 3- Aminopropionamid
4 –MeI	:4(5)-metilimidazol
AA	: Akrilamid
ACF	: anormal kript odaklarını
ADI	:Allowed Daily Intake-İzin Verilen Günlük Alım
ALT	:alanin aminotransferaz
Asn	:asparajin
Asp	:aspartat
a _w	:Su aktivitesi
CML	:Karboksimetillizin
EKG	:elektrokardiyogram
FDCA	: 2,5-furandikarboksilik asit
FMO	: flavin içeren monooksijenaz
GA	: glisamid
GABA _{AR} :	:Gama aminobütirik asit(A) reseptörü (R)
5-HMF	:5-Hidroksimetil-2-furfural
5-HMFA	:5-hidroksimetil-2-furoik asit
5-HMFG	:5-hidroksimetil-2-furoil-glisin
IARC	:Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
KVH	:Kardiyovasküler hastalık
LAB	:Laktik asit bakterileri
MİK	:Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NTP	:Ulusal Toksikoloji Programı
OEHHA	:Environmental Health Hazard Assesment
SMF	:5-sülfoksimetilfurfural
SNFA	:İsveç Ulusal Gıda İdaresi



1.GİRİŞ

Dünyada artan nüfusun güvenilir gıda talebini karşılayabilmek ve gıdanın bozulmadan insan beslenmesinde kullanılmasını sağlamak için ürünlere doğru işlemler uygulanmalı ve gıdalar uygun koşullarda muhafaza edilmelidir. Gıdaların daha uzun süre dayandırılması amacıyla uygulanan işlemlerden biri olan ısıl işlemle,mikroorganizmaların gelişimi önlenebilmekte, istenmeyen enzimler inaktive edilebilmekte veya gıdaların duyuşal özellikleri geliştirilebilmektedir. Bu amaçla gıdalar; pişirme, kızartma, ekstrüzyonla pişirme, pastörizasyon veya sterilizasyon vb. gibi ısıl işlemlere tabi tutulabilir (Yıldız ve ark., 2010). Uygulanan bu ısıl işlemler sırasında istenmeyen birçok mutajenik ve kanserojenik bileşikler oluşabilmektedir (Capuano ve Fogliano, 2011).

Bu bileşiklerin başında akrilamid, furan ve türevleri, heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozamin, kloropropanol ve esterleri yanında, Maillard esmerleşme reaksiyonlarında şeker ve amino asitten oluşan imidazol ve türevleri gibi bileşikler gelmektedir(Şimşek ve ark.,2015). Bunlar karbonhidrat, yağlar ve proteinlerle zenginleştirilmiş bileşiklerde oluşan ana bileşiklerdir. Genotoksisite, nörotoksisite, potansiyel kanserojen ve üreme toksisitesi gibi çeşitli toksisite gösterdikleri ve potansiyel kanserojen bileşikler oldukları bilinmektedir (Zhao ve ark., 2017).

Oluşan bu kimyasal bileşiklerden olan akrilamid (C_3H_5NO ; $CH_2CHCONH_2$; 2-propenamid) 71.08 kDa molekül ağırlığına sahip suda yüksek miktarlarda çözünebilen renksiz, uçucu olmayan, kristal katı bir bileşiktir (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014). 2-propenamid, etilen karboksiamid, akrilik amid, vinilamid gibi farklı isimlerle de bilinir (Gölükcü ve Tokgöz, 2005). Biyolojik olarak ve yüksek oranda su, aseton, etanol ve dietil eter içinde çözünebilen bir bileşiktir (Riboldi ve ark.,2014).

Akrilamidin gıdalardaki varlığı ilk olarak 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda İdaresi (SNFA) tarafından bildirilmiştir. Isıl işlemle (120 °C ve daha yüksek),

çoğunlukla patates, tahıl ve unlu mamüllerde oluşan, ısı ile indüklenen önemli kontaminant olarak kabul edilmektedir (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014). Haşlanmış gıda ürünlerinde akrilamid (AA) bulunmamaktadır (Vleeschouwer ve ark.,2007). Tütün dumanının bir bileşeni olarak, sigara içmek veya pasif sigara içmek de insanın akrilamide (AA) maruz kalmasının önemli bir kaynağı olarak gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018).

Elektrofilik reaktiviteye sahip bir α -doymamış (konjüge edilmiş) karbonil bileşiği olan akrilamid, son zamanlarda yaşam gelişiminden yaşlanmaya kadar olası bir risk faktörüdür (Zhang ve ark., 2018). Akrilamidin akut toksitesisi üzerine yapılan çalışmalarda oral LD50 değerleri 159-300 mg/kg vücut ağırlığı olarak rapor edilmiştir (Aktaş, 2008). Kemirgenlerdeki karsinogenitesine bağlı olarak 1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından insanlara potansiyel bir kanserojen olarak (grup 2A) sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma, 2002 yılında WHO Konsültasyonu tarafından onaylanmıştır (Krishnakumar ve Visvanathan, 2014).

Potansiyel kanserojen ve nörotoksik bir bileşik olan akrilamidin oluşum miktarını azaltmak için temel başlangıç materyali olan serbest asparagin miktarını azaltma fikri öngörülmüştür. Bu amaçla asparajinaz enziminin eklenmesiyle öncü asparajin, aspartat ve amonyağa hidrolize olmuş ve gıda üretiminin başlangıç materyallerindeki serbest asparagin miktarı azalarak oluşabilecek akrilamid miktarı kısmi ya da tamamen azalmıştır (Linke, 2015).

Gıdaların üretim, depolama ve saklama aşamalarında meydana gelebilen esmerleşme reaksiyonları enzimatik olan veya enzimatik olmayan reaksiyonlar olarak ikiye ayrılır. Maillard reaksiyonu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarından en önemlisidir. Maillard reaksiyonları, genellikle yüksek sıcaklıkta işlemde geçirilen çok çeşitli gıda ürünlerinde meydana gelebilmektedir. Bu reaksiyon aminoasit ve proteinlerdeki amino grubu ile indirgen şekerler arasında sıcaklıklarda gerçekleşir (Kılıçer, 2011; Akıllıoğlu ve ark., 2011).

Maillard reaksiyonunda bir ara ürün olarak oluşan gıda toksik maddelerinden biri 5-Hidroksimetil-2-furfural (5-HMF) hem aldehid hem de alkol (hidroksimetil) fonksiyonel grupları içeren bir furan türevi olan altı-karbonlu heterosiklik bir aldehittir. Halkanın yapısı furan kısımlarına dayanırken, iki fonksiyonel grup, yani formil ve hidroksimetil grubu, sırasıyla 2 ve 5 pozisyonunda halka ile bağlantılıdır (Capuano ve Fogliano, 2011; Durling ve ark., 2009; Kowalski ve ark., 2013; Shapla ve ark., 2018). Molekül formülü $C_6H_6O_3$, molekül ağırlığı 126.11 g/mol, kaynama noktası 110 °C, erime noktası 31.5 °C'dir (Kowalski ve ark., 2013).

5-HMF, gıdaların proses aşamasında maruz kaldığı ısı işlem koşulları hakkında bilgi verir ve polimerize olarak esmer renkli pigmentlerin oluşumuna neden olur. Isıl işlem şiddeti arttıkça (sıcaklık ve süre) 5-HMF miktarının da arttığı bilinmektedir. Ca, K, Mg gibi bazı minerallerle, alanin, aspartik asit gibi aminoasitler 5-HMF konsantrasyonunu artırır (Işık, 2008). 5-HMF'nin günlük ortalama alımına ilişkin veriler çok sınırlı olmakla birlikte kahve ve ekmek en önemli katkı sağlayan gıda maddeleri (toplam 5-HMF günlük maruziyetinin % 85'i) olmak üzere ortalama 10 mg /gün 5-HMF alımı olduğu düşünülmektedir (Kowalski ve ark., 2013).

D-glikoz ve amonyaktan oluşan Maillard reaksiyon sisteminde oluşan mutajenik maddelerden biri de imidazollerden 4(5)-metilimidazoldür (4 –MeI) (Moon ve Shibamoto, 2011). 4 –MeI, 82.1 kDa molekül ağırlığına sahip nispeten basit bir bileşiktir. Su ve etanol içinde yüksek seviyede çözünür. Erime noktası 46-48 °C ve kaynama noktası 263 °C'dir. Beş üyeli basit bir heterosiklik bileşiktir. Bu halka sistemi amino asit, histidin ve ilgili proteinler ve enzimler gibi çeşitli biyolojik maddelerde bulunur (Moon ve Shibamoto, 2011).

2007'de Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) 4–MeI' ü kansere neden olan bir bileşik olarak tanımladığından ve Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA)'nın 7 Ocak'ta bir öneri ile 65 bileşik listesine kanserojen olarak eklediğinden birçok araştırmacı ve düzenleyici kurum, yiyecek ve içeceklerde 4-

(5)-MeI'nin varlığına odaklanmış ve bu konuda çalışmalar artmıştır(Hengel ve Shibamoto,2013; Moon ve Shibamoto, 2011). 4 –MeI çeşitli yiyecek ve içeceklerde karamel renginde tanımlanır. Çeşitli çalışmalar karamel renginde 0-1000 ppm arasında, karbonatlı içeceklerde 0-500 ppm arasında değişen seviyelerde mevcut olduğunu göstermiştir (Klejdus ve ark., 2006;Çelik, 2013).

Bu çalışmanın amacı diyetle alınan gıdalarda bulunan ve sağlık üzerine olumsuz etkileri bilinen ısıtıl işlemin sebep olduğu gıda kontaminantlarından akrilamid, 5-HMF ve 4-MeI'ün *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* üzerine inhibisyon etkisini araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Isıl işlemler gıdaların hazırlanması ve muhafazası aşamalarında mikroorganizma ve enzim inaktivasyonu, tat ve lezzet gelişimi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Uygulanan ısı işlemler gıdaların tat-koku ve lezzetinde gelişmeye neden olmasının yanında gıdalarda yapısal ve bileşimsel önemli değişikliklere de neden olmaktadır. Bunlar protein denatürasyonu, lipit oksidasyonu, Maillard reaksiyonu, karamelizasyon ve vitaminlerin parçalanmasıdır (Saldamlı ve ark., 2014).

Hızlı artan dünya nüfusu güvenli gıda teminini zorlaştırmaktadır. Birçok tehlike gıda güvenliğini tehdit etmekte ve gıdaların sağlığını bozucu unsurlar haline gelmesine neden olabilmektedir. Güvenli ve sağlıklı gıda, besleyici değerini kaybetmemiş, fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikeler açısından temiz ve bozulmamış gıdalar olarak tanımlanabilir. Sağlıklı ve güvenilir gıda üretiminin sağlanması, gıdaların üretim, taşıma, depolanma, dağıtım ve tüketim aşamalarında gerekli kurallara uyulması ve önlemlerin alınmasını zorunlu kılar (Erkmen, 2010).

Hayatın devamlılığı için en önemli husus olan beslenme, tüm insanları içine alan günlük bir yaşam etkinliğidir. Beslenmenin yeterli ve dengeli olabilmesi ise ancak gıdaya yeterli, güvenli ve sağlıklı bir şekilde erişme ile mümkündür. Beslenme ile sağlık arasındaki ilişki gıda ürünlerinin üretimi sürecinde bir bütün olarak ele alınması gereken gıda üretim sürecinin her aşamasındaki katkılar ve işleme tekniklerini içine alan ve üretim kontrolünün devamlı olması gereken bir konudur (Kocatepe ve Tırıl, 2014 ; Koç, 2015).

Gıdalara uygulanan ısı işlemler sırasında meydana gelen reaksiyonlar sonucu, olumsuz sağlık etkileri olabilen ve gıda güvenliğini tehdit eden bileşikler oluşur. Bu bileşiklerden başlıcaları akrilamid, furan ve kloropronal türevleri gibi bileşiklerdir ve bunlar ‘termal proses kontaminantları’ olarak adlandırılmaktadır (Saldamlı ve ark., 2014).

2.1. Maillard Reaksiyonu

Maillard reaksiyonu, gıdaların renk, lezzet, tat ve beslenme kalitesini etkileyen önemli ve en karmaşık tepkimelerden birisidir. Gıda güvenliği açısından mutajenlerin oluşumuna neden olmaktadır. Proteinlerdeki değişimlere neden olmasıyla proteinlerin hem fizyolojik hem fonksiyonel özellikleri yönünden irdelenmektedir (Boekel, 2001; Saldamlı ve ark., 2014).

Maillard esmerleşmesi, lipit esmerleşmesi ve askorbik asit esmerleşmesi reaksiyonları temelde benzerlikler taşırlar ve aralarındaki en önemli fark karbonil bileşiklerinin farklı olmasıdır. Bazı araştırmacılar bu farkı önemsiz görüp üç reaksiyonu da Maillard reaksiyonu olarak adlandırmaktadır (Cemeroğlu, 2016). Aminoasitler ve indirgen şekerler arasındaki enzimatik olmayan karbonil-amin reaksiyonları sonucu ortaya çıkan esmerleşme, Maillard reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Fransız hekim ve kimyacı Louis Camille Maillard tarafından 1912 yılında keşfedilmiştir (Giribet ve Ribas, 2000; Saldamlı ve ark., 2014).

Hodge 1953 yılında yayımladığı makalede Maillard reaksiyonunu üç bölüme ayırarak incelemiştir. Esmerleşme sırasında meydana geldiği bilinen yedi farklı reaksiyon tipini ortaya koyduğu reaksiyonları, gelişimin üç aşamasına göre sınıflandırmıştır. Reaksiyon Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Hodge, 1953).

I. Başlangıç aşaması (renksiz; ultraviyole yakınında emilim yok)

- A. Şeker-amin yoğunlaşması
- B. Amadori düzenlemesi

II. Ara aşama (renksiz veya sarı, ultraviyole yakınında güçlü emilim)

- C. Şeker dehidrasyonu
- D. Şeker parçalanması
- E. Amino asit bozunması

III. Son aşama (çok renkli)

- F. Aldol yoğunlaşması
- G. Aldehid-amin polimerizasyonu (Hodge, 1953).

I. Başlangıç aşaması (renksiz; yakın ultraviyole emilim yok)

A.Şeker-Amin Yoğunlaşması: Şeker-amin yoğunlaşması için kabul edilen mekanizma, şekerin halka formunun açılmasını, karbonil grubuna aminin ilave edilmesini ve daha sonra ikame edilmiş glikosilamini oluşturmak için bir su molekülünün ayrılmasıyla bir Schiff bazı türevinin (imin) geri dönüşümlü olarak oluşmasını içerir.Şeker-amin esmerleştirme reaksiyonlarında diglikosilaminler oluşabilir.Şekerlerin ve aminlerin indirgenmesinin esmerleşme reaksiyonlarında eşmolar oranda yoğunlaştığı sonucuna varılabilir.Şeker-amin yoğunlaşması glikozil-amin ürününün oluşumu ve ardından Amadori düzenlemesini içerir (Hodge, 1953).

B. Amadori Düzenlemesi:Yeniden düzenleme hem birincil hem de ikincil aralkil ve alkilaminlerin Ar-glikosil türevleri ile de meydana gelebilir. Ayrıca N-süstitüe edilmiş glikosilaminlerin yeniden düzenlenmesi, 25°C'de neredeyse kuru halde kendiliğinden meydana gelmiştir. Amadori yeniden düzenlemesi bloke edildiğinde meydana gelen kızarıklığın da bloke edildiği gözlenmiştir. Amadori yeniden düzenleme ürünleri nemli, asidik ortamlardaki orijinal glikosilaminlerden daha kararlı olmasına rağmen, kuru halde bile hala ısıya dayanıksızdır. Isıtmada, dehidrasyon ve fizyonağrarlar ve renksiz indirgenlerin yanı sıra kahverengi floresan maddeler verir. Amadori yeniden düzenleme ürünleri alkali pH'ta sulu çözeltilerde tek başına kahverengileşme ayrışmasına uğrar ve amino asitlerin varlığında kahverengileşme oranı önemli ölçüde artar (Hodge, 1953). Amadori düzenlemesinde Schiff bazının C=N çift bağına komşu olan karbondaki hidroksil grubunun hidrojeni azota kayar ve geriye bir keton kalır. Schiff bazına göre Amadori ürünlerinin daha stabil olması halka yapıda olmasıyla açıklanmaktadır (Saldamlı ve ark., 2014).

II. Ara Aşama (renksiz veya sarı, yakınu ultraviyole güçlü emilim)

Esmerleşmenin ilk aşamasında (A ve B reaksiyonları) ultraviyolede spektrofotometrik ölçümlerle tespit edilemez; bununla birlikte, görünür kızarıklık

başlamadan önce, ara aşamanın başlangıcını açıklayan güçlü bir soğurma olduğu görülmektedir (Hodge, 1953).

C. Şeker Dehidrasyonu: İki tip şeker dehidrasyon reaksiyonu bilinmektedir. Asidik sistemlerde ($\text{pH} < 3$) furfurallar oluşur. Bazik sistemlerde ($\text{pH} > 8$) sistemlerde aminlerin varlığında, 6-karbon ve diğer indirgenler oluşur (Hodge, 1953). 3 farklı tepkime yolu bulunur. Birinci yolda 1- amino-1-dezoksi-2-ketoz'dan 2 mol su ayrılmasıyla indirgenler oluşur. İkinci yolda şekerlerin dehidrasyonu ile 1-amino-1-dezoksi-2-ketoz'dan 3 mol su ayrılmasıyla furfural bileşikleri (5-Hidroksimetilfurfural ve furfural) oluşmaktadır. Strecker degradasyonu adı verilen üçüncü yolda 1-amino-1-dezoksi-2-ketoz etkisiyle ortamdaki aminoasitlerin oksidasyonu gerçekleşir ve sonuçta aldehit ile CO_2 oluşur. Streckerdegradasyonunda en önemli nokta halka yapısının açılarak 1,2 ve 2,3 enolizasyonlarının gerçekleşmesidir (Özhan, 2008).

D. Şeker Parçalanması: Şeker parçalanması için kabul edilen mekanizma aldol yoğunlaşmasının tersidealdolizasyondur. Aminler veya amin tuzlarının aldol yoğunlaşmasını katalizlediği bilinir (Hodge, 1953).

E. Amino Asit Bozunması: Amino asitlerin glikoz veya furfural ile bozunmasında çok az amonyak açığa çıkmıştır. Hodge, Maillard esmerleşme reaksiyonlarında serbest kalan karbondioksitin şeker radikalinden ziyade amino asidin karboksil grubundan gelmiş olması gerektiğini söylemiştir. Aldehit üretimi şeker-amino asit esmerleşme reaksiyonlarında karbondioksit gelişimine paraleldir. Optik sıcaklık birimi başına düşük sıcaklıklarda, yüksek sıcaklıklara göre daha az karbondioksit üretilmiştir ve 56.5°C 'de oluşan melanoidinlerin, 100°C 'de Maillard'ın koşulları altında oluşturulanlardan daha fazla etiketlenmiş karbon içerir. Hem proteinler hem de amino asitler asetaldehid ile çok hızlı kahverengileşme reaksiyonlarına maruz kalır, ancak formaldehit ile hiçbir kahverengileşme görülmez. Glisin (Strecker bozunması ile formaldehit, alanin ile asetaldehit veren)aldehidlerin üretiminde ana renk üreten reaksiyondur. Bu nedenle, Strecker

bozunmasının, melanoidin oluşumuna yol açan bir reaksiyon olduğu sonucuna varılmıştır (Hodge, 1953).

III. Son aşama

Kızarmanın son aşamasında ara ürünler polimerize olur ve doymamış, floresan, renkli polimerler oluşur. İlgili başlıca reaksiyonlarda aldol kondensasyonu, aldehid-aminpolimerizasyonu ve pirollar, imidazoller, piridinler ve pirazinler gibi heterosiklik nitrojen bileşiklerinin oluşumu gerçekleşir (Hodge,1953).

F. AldolYoğunlaşması: Diasetil'in aldol yoğunlaşması önce iki molekül arasında sıradan aldol oluşturarak devam eder. Daha sonra molekül içi kondensasyonla 2,5-dimetil/i-kinon elde edilir (Hodge,1953).

G.Aldehit-AminPolimerizasyonu ve Heterosiklik Azot Bileşiklerinin Oluşumu: Basit aldehidler ve aminler, hatta asetaldehit ve amonyak, düşük sıcaklıklarda kolayca reaksiyona girer ve yapıları bilinmeyen polimerik renkli ürünler oluştururlar. Alifatik aldehitler iki farklı tip ürün oluşturmak için aldiminlerle yoğunlaşır. Bu ürünler, dimerik, doymamış, konjuge bir aldimin ve - ikameli bir dihidropiridindir.Hem aldehit hem de aldimin bulunduğu melanoidin oluşumunda da yoğunlaşmalar meydana gelebilir Piridinlerin bu şekilde oluşumu piridinlerin melanoidinlerden damıtılmış olduğu gerçeğini açıklayabilir (Hodge,1953).

Maillard reaksiyonu etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; pH, nem ve su aktivitesi, metal iyonları, şekerin yapısı, amino grubunun yapısı, reaksiyona giren tepkenlerinkonsantrasyonu, sıcaklık ve süre, gıdanın bileşimi, tampon gibi faktörlerdir (Martins ve Boekel, 2005).

Sıcaklık: Maillard reaksiyonu farklı aşamalarda gerçekleşir. Bu aşamalarıda gerçekleşen reaksiyon sıcaklıkları birbirinden farklıdır. Bu nedenle 20-60 °C gibi oldukça düşük sıcaklıklarda elde edilen kinetik sonuçlar, 100-150°C'da elde edilenlerle birebir karşılaştırılmaz (Boekel,2001). Ancak Maillard reaksiyonunun, sıcaklık artışına bağlı olarak da hızlandığı bildirilmektedir. Her

10°C sıcaklık artışı, esmerleşme reaksiyon hızını ürünün içerdiği su oranına bağlı olarak 6-8 kat arttırdığı bilinmektedir (Özhan, 2008).

pH ve Tampon: Şekerin açık zincir konsantrasyonu reaksiyondaki önemli bir parametre olan pH'a bağlıdır. pH, suyun ayrışmasının artması nedeniyle sıcaklıkla azalır. Reaksiyon 3-8 pH aralığında gerçekleşirken pH değeri yükseldikçe de reaksiyon hızı artar. Fosfat ve asetat gibi tamponlar reaksiyonu katalize ederek reaksiyon hızını arttırabilir (Boekel,2001;Saldamlı ve ark., 2014).

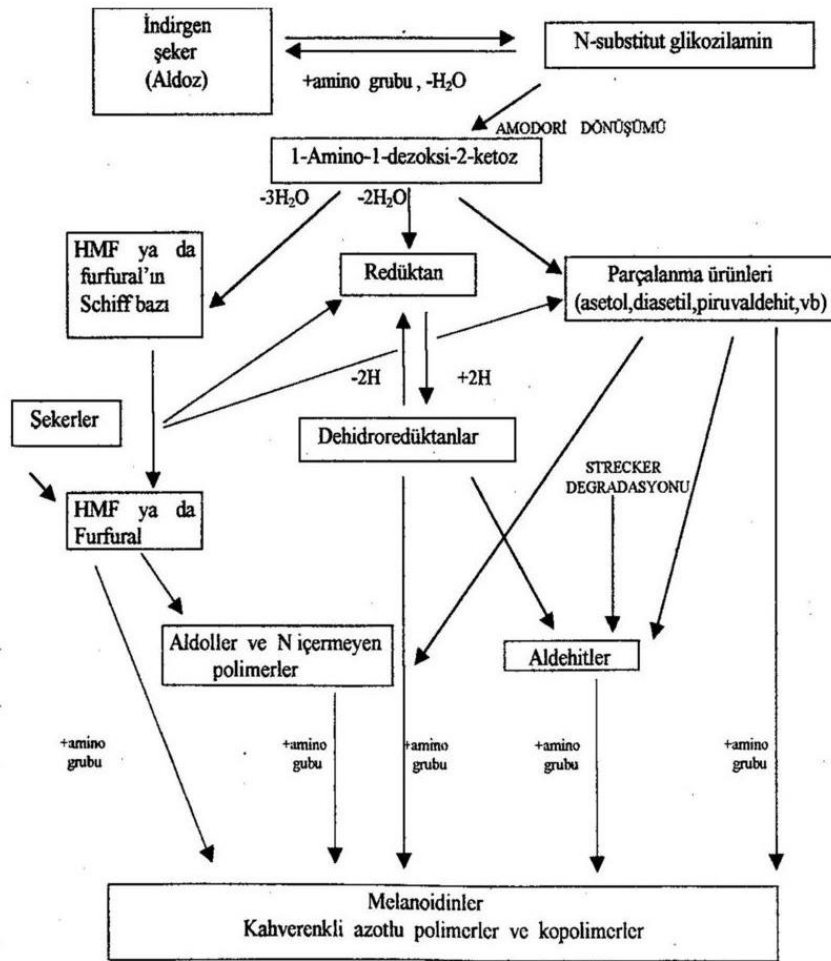
Şeker Tipi:Şekerlerin esmerleşme kapasitesinde farklılıklara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Genel olarak kabul edilen bu farklılıklar açık zincir biçimindeki farklılıklara atfedilmiştir. Açık zincirde daha yüksek konsantrasyona sahip şekerler daha hızlı ve daha yoğun kahverengileşmeye neden olmaktadır. Bu aynı zamanda, örneğin, heksozlar ve pentozlar arasındaki farklar için de geçerlidir (Boekel,2001). Charissou ve ark. (2007) glikoz ve früktozun reaksiyon üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada früktozun ürün oluşturmada daha az reaktif bir şeker olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Su aktivitesi (a_w) : Suyun Maillard reaksiyonunda çözücü ve tepken olarak ikili bir rolü vardır (Boekel,2001). Çok düşük ya da çok yüksek a_w değerlerinde Maillard reaksiyon hızı yavaşlamaktadır (Burdurlu ve Karadeniz, 2002). Reaksiyon 0.6 -0.7 a_w aralığında yüksek su aktivitesinde gerçekleşmektedir (Özhan, 2008).

Metal iyonları: Maillard reaksiyonunda ovalbumin-glikoz sisteminde yapılan bir çalışmada metal iyonlarından Na^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ,nin reaksiyonu hızlandırıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Burdurlu ve Karadeniz, 2002).

Amino asitlerin etkisi: Amino asitlerin Maillard reaksiyonuna glikoz $\pm$ aspartik asit, glikoz $\pm$ glutamik asit ve glikoz $\pm$ asparajin (Asn) sulu model çözeltilerde ve yüksek sıcaklıklarda araştırılmıştır. Bu sonuçlara, göre aspartik asit en reaktif amino asit ve glutamik asit ise en az reaktiftir. Arrhenius modeline göre Asn çözeltilerinin sıcaklığa en duyarlı olduğu, aspartat (Asp) çözeltilerinin en az hassas olduğu bulunmuştur. (Giribet ve Ribas, 2000).

Maillard reaksiyonunda oluşan reaksiyon ürünleri; N (ε) -2-furoilmetil-1-lizin (furosin), pirolin, N (ε) - (1-karboksietil) -1-lizin (CEL), pronil-lizin, N (ε) - karboksimetillizin (CML), pentosidin, hidroksimetilfurfural (5-HMF), imidazoller, akrilamid, α- dikarbonil bileşikler, N-ε-fruktosillisin, N-ε-karboksimetillisin ve N-ε-karboksietilizin, glikosal ve metilglikosaldır (Çelik ve Gökmen, 2020; Li ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Maillard Reaksiyonu (Hodge, 1953)

2.2. Akrilamid

Kızartılan ve fırınlanan gıdalarda oluşan akrilamid (AA), Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından Grup 2A potansiyel bir kanserojen olarak sınıflandırıldığı için giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Gıdalarda ısıtma işlemi sırasında oluşur. Özellikle 120°C'nin üstünde pişirilen karbonhidrat indirgen şeker açısından zengin gıdalarda esas olarak Maillard reaksiyonunun asparajin ve indirgen şeker içeren Strecker bozunma sürecinden oluşmaktadır (Yu ve ark., 2019; Krishnakumar ve Visvanathan, 2014).

Gıda işleme sırasında AA oluşumunu sınırlamak için çeşitli azaltma stratejileri önerilmiştir. Metal katyonlarının eklenmesinin AA oluşumunu engellemek için mükemmel bir strateji olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2017). Karbonhidrat bakımından zengin, protein bakımından düşük olan kek, ekmek, patates kızartması ve cips gibi derin yağda kızartılmış veya pişmiş gıda maddelerinin en yüksek AA seviyelerini içerdiğine inanılmaktadır. Kahve içerisindeki AA konsantrasyonunun nispeten düşük olmasına rağmen, yüksek miktarda tüketilmesi yetişkinlerde AA maruziyetine neden olur (Rifai ve Saleh, 2020). Dybing ve Sanner'in Norveç'te yaptığı maruziyet değerlendirme çalışmasında yiyecek ve kahvede bulunan günlük ortalama akrilamid alımının, erkeklerde ve kadınlarda vücut ağırlığının kg'ı başına sırasıyla 0.49 ve 0.46 µg olduğu tahmin edilmektedir (Dybing ve Sanner, 2003).

2.2.1. Akrilamid Oluşum Mekanizması

Akrilamid oluşumu için üç yol mevcuttur:

1. Akrilamid oluşumu için kabul edilen ana yol karbonhidratlar ve proteinler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu yoludur.
2. Lipitlerin transformasyonu, karbonhidratlar ve aminoasitlerin ayrışması yoluyla ortaya çıkan akrilein ya da akrilik asit reaksiyonu yolu,

3. 3-aminopropionamid (3-APA) bileşiği üzerinden oluşum yolu mevcuttur (Karagöz, 2009; Rifai ve Saleh, 2020).

Gıdalarda AA oluşumu için ana yol Maillard reaksiyonu yoluyla asparajin yolu olarak bilinir. N-glikozitler yolunda, asparajin, mutlaka bir karboksil bileşiğinin (indirgeyici şeker gibi) varlığına ihtiyaç duyan termal dekarboksilasyon ve deaminasyon yoluyla AA'e dönüştürülür. α -hidroksi karbonil, asparajinin AA'e dönüştürülmesinde di-karbonillerden daha etkilidir ve iki α -hidroksi karbonil grubu içeren früktoz, glikoz gibi indirgen şekerler ile karşılaştırıldığında AA oluşumunu yaklaşık 2 kat daha fazladır. Bu yolakta, asparajin ve indirgen şekeri arasındaki reaksiyon dekarboksillenmiş bir Schiff bazı, N-glikosilaz-parajin üretir. Bu da parçalandıktan sonra doğrudan AA ve bir imine yol açar. Hammaddelerde bulunan dekarboksilazlar, asparajinden biyojenik amin 3-APA üretebilir ve daha sonra termal olarak AA'e deamine edilir (Xu ve ark., 2014).

Akrilamid oluşumu için başka bir teoriye göre akrolein öncül bir maddedir. Akrolein ve akrilik asit, özellikle yağların uygun olmayan yüksek bir sıcaklıkta ısıtılması, gliserolün dehidrasyonu, aminoasitler, proteinler veya karbonhidratların parçalanması, aminoasitlerle ya da proteinlerle karbonhidratlar arasındaki Maillard reaksiyonu ile oluşabilmektedir. Akrolein akrilik aside yükseltgenmekte, akrilik asit de gıdalardaki azotlu maddelerin (amino asitlerin bozunmasından) sıcaklık etkisiyle bozunması sonucu oluşan amonyak ile reaksiyona girerek akrilamidi oluşturmaktadır (Claus ve ark., 2008).

Son çalışmalar, hammaddelerde bulunan dekarboksilazların biyojenik amin 3-aminopropionamid (3-APA) adı verilen başka bir bileşiğin Maillard reaksiyonu sırasında termal koşullarda AA oluşturulabileceğini ve sulu çözeltilerde AA'e dönüştürülebildiğini göstermiştir. Bu bileşik kakao çekirdekleri, kahve ve tahıl ürünlerinde tanımlanmıştır. Kofaktör olarak piridoksal fosfat yoluyla amino asitlerden biyojenik aminlerin oluşumu, mevcut enzime bağlı bir reaksiyondur. Son yayınlar asparajinin termal bozunması sırasında akrilamid oluşumunda geçici bir

ara madde olarak 3-aminopropanamid (3-APA)'yı, işaret etmiştir (Rifai ve Saleh, 2020; Zhang ve Zhang, 2007).

Bir asparajin/glikoz karışımıyla karşılaştırıldığında, 3-APA'dan oluşan akrilamid miktarlarının beş kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Diğer deneyler, bozulmamış patateslerin (20 veya 35°C) saklanması sırasında veya hücrelerin ezilmesinden sonra 3-APA'nın oluştuğunu göstermiştir. 3-APA'nın sulu veya düşük nem koşulları altında, model sistemlerde 100 ve 180°C arasındaki sıcaklıklarda ısıtılması daha fazla akrilamid ürettiğinden akrilamidin öncüsü olarak 3-APA'ya işaret etmektedir.(Rifai ve Saleh, 2020; Zhang ve Zhang, 2007).

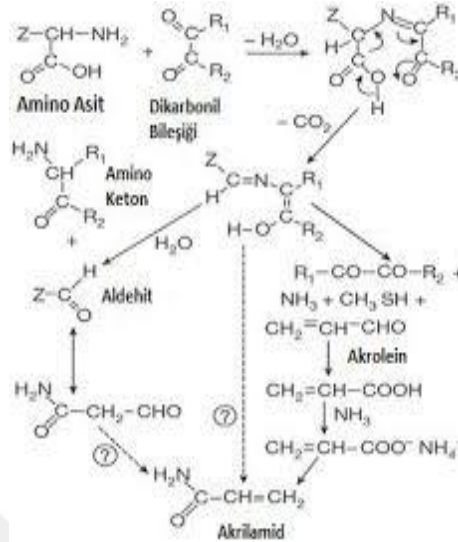
Akrilamid oluşumu için serbest asparajin,serbest indirgen şeker, yüksek sıcaklık (>120°C), gıdanın yüzeyindeki düşük nem gibi koşullar gerekmektedir. Maillard reaksiyonu esas olarak bir yüzey reaksiyonudur, bu nedenle ekmek yüzeyindeki AA miktarı en fazladır (Rifai ve Saleh, 2020).

Zyzak ve ark. (2003), akrilamid oluşumu için bir mekanizma sunmuşlardır. Akrilamid oluşumunu incelemek için, “akrilamid üretmeyen” bir matris sağlayan bir model gıda sistemi geliştirilmiştir. Gereken model gıda sisteminin, yenilebilir bir gıda olması ve sistemin ısıtıldığında akrilamid üretmeyen en basit başlangıç hammaddelerini içermesi gereklidir. Bu sistemde jelatinleşmemiş patates nişastası ile her birinde 400 g su bulunan modeller oluşturulmuştur. Su başlangıçta 65 °C'ye önceden ısıtılmış ve eklenen katkı maddeleri (D-glikoz, maltodekstrin, amino asitler, vb.) çözünene kadar karıştırılmıştır. Eklenen tipik D-glikoz miktarı 5.6 g iken, ilave edilen tipik maltodekstrin miktarı 18 g'dır. Amino asit ilavesi, 0 ila 10 g arasında değişmiştir. Çözünmenin ardından 2.4 g sıvı emülgatör (mono-digliseritler) ilave edilmiştir.Son adım, suya patates nişastasının ilave edilmesi, hamurun hazırlanması ve 205 °C'de orta oleik ayçiçek yağı içinde 3-30 saniye kızartılması olmuştur.

Mekanizma, bir Schiff bazının oluşumunu takiben dekarboksilasyon ve akrilamid vermek üzere amonyak veya ikame edilmiş bir iminin ısı altında ortadan kaldırılmasını içermiştir. Karbonil kaynağı olarak kullanılan 2-deoksiglikoz'un

benzer seviyelerde akrilamid oluşturduğunu göstermişlerdir. 2-deoksiglikoz karbonile bitişik bir hidroksil grubu olmadığından, sadece Schiff bazı ilave maddesini oluşturabilmiştir. Bu gözlemler akrilamid oluşumunda karbonillerin gerekli olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli karbonil kaynaklarının ısı altında asparajinden akrilamid üretebileceği gözlenmiştir. Sonuçlar, asparajin yan zincir amid grubunun akrilamidin amid bağına dahil edildiğini göstermektedir. Bu mekanizmada amid bağını asit veya enzim ile hidrolizle bozarak gıdadaki akrilamidi ölçme yöntemiyle ana yolun asparajin olup olmadığı kanıtlanmaya çalışılmıştır (Zyzak ve ark., 2003).

Gıda modelinin asparajinaz ön işlemi aynı işlemle fakat enzim olmadan hazırlanan numunelere kıyasla %88'lik bir asparajin azalması ve % 99'dan daha fazla bir akrilamid azalması sonucunu göstermiştir. Bu sonuç yine bir patates ürünüde akrilamid oluşumuna giden ana yolun asparajin yoluyla olduğunu göstermektedir. Buna göre gıdanın serbest asparajin içeriği ile üründe oluşan akrilamid içeriği arasında doğrusal bir ilişki vardır. Isıl işlem görmüş patates ürünlerinde yüksek oranda akrilamidin bulunması, patatesten bulunan amino asitlerin yaklaşık %50'sinin serbest formda olması ve bunun da %50'sini asparajinin oluşturmasından ileri geldiği bildirilmektedir (Zyzak ve ark., 2003).



Şekil 2.2. Maillard Reaksiyonu ve Akrilamid Oluşumu (Çelik, 2013)

Vattemve Shetty (2003) nişastalı gıdalara ısıt işlem uygulanması yoluyla akrilamidin oluşum mekanizmasını açıklamışlardır. Marketten satın alınan patatesler 3 mm kalınlığında dilimlenerek gruplara ayrılmıştır. Gruplara farklı işlemler uygulanmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak yalnızca suya batırılmıştır. İkinci grup kızılçık tozu ve kekik özüne, üçüncü grup nohut ununa daldırılmıştır. Sonrasında kızartma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Akrilamid oluşumu, patates dilimlerinde kızılclık ve kekik özlerinden fenolik antioksidanların varlığından etkilenmemiştir, ekzojenfenolikler mevcut olduğunda artmıştır. Bu, akrilamid oluşumunun doğada oksidatif olmadığını göstermiştir. Bu nedenle lipidoksidasyonu yoluyla oluşum olasılığı oldukça düşüktür. Baklagil proteinlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı akrilamid oluşumunu azaltma üzerindeki etkisi de gözlenmiştir. Nohut kaynaklı ısıya dayanıklı proteinler, kızarmış patates dilimlerinde akrilamid oluşumunu azaltmış olabileceği düşünülmüştür (Vattemve Shetty, 2003).

Kompleks nişasta içeren gıdalarda uygulanan yüksek sıcaklıkla öncelikle serbest nişasta açığa çıkmış ve ısıl işlemle birlikte indirgen bir şeker olan glikoza

kadar parçalanma gerçekleşmiştir. Glikoz bir seri enolizasyon ve enomerizasyon reaksiyonlarına uğrayarak ara ürün olan 2,4-deoksi şekerlere parçalanmış ya da serbest aminoasitlerle aynı şekerlerin oluşturduğu Maillard reaksiyonuna girmiştir. 2,4-deoksi şekerler ketoenolizasyonla 2,5-deoksidiluloza dönüşmüştür. Stabil yapıda olmayan bu şeker asetaldehit ve formaldehite parçalanmıştır. Oluşan asetaldehit ve formaldehitin kondensasyonu ile alkoksit oluşmuş, bu bileşiğin su kaybetmesi ile 2- propenal oluşmuştur. İki adet 2- propenalın Cannizaro reaksiyonuna uğramasıyla oluşan akrilik asit ve propenolden akrilik asite bir amonyum bazının bağlanması sonucu akrilamid oluşumu gözlenmiştir (Vattem ve Shetty, 2003).

2.2.2. Akrilamid ve Gıda

Nguyen ve ark., (2016) bisküvide şeker türü ve miktarının akrilamid ve 5-hidroksimetilfurfural oluşumu üzerine etkileri araştırmak amacıyla sükroz, glikoz, früktoz ve früktoz+glikoz karışımı içeren dört tip bisküvi hazırlamışlardır. 200 °C'de pişirme sırasında farklı tip ve miktarlarda şeker içeren bisküvilerde akrilamid ve 5-HMF oluşumu için modeller kullanılmıştır (Nguyen ve ark., 2016).

Modelleme sonuçları, dört bisküvi tarifinin tamamı için akrilamid ve 5-HMF oluşumunda en uygun model olmuştur. Deneysel veriler 5-HMF konsantrasyonunun glikoz ve früktozlu bisküvilerde en yüksek olduğunu, akrilamid konsantrasyonunun da en yüksek asparajin konsantrasyonuna sahip olan glikozlu bisküvilerde en yüksek olduğunu göstermiştir. Önerilen mekanik modeller, 5-HMF'nin karamelizasyon yoluyla oluşturulduğunu ve akrilamid oluşumunun spesifik amino asit yolunu izlediğini, yani, Amadori yeniden düzenleme ürünü ve şeker fragmentasyonu olmadan akrilamid oluşturmak için dekarboksilasyondan önce Schiff bazı oluşturmak üzere asparajin ile reaksiyona girdiğini göstermiştir (Nguyen ve ark., 2016).

Glikoz früktoz karışımında früktozun glikoza oranı 1'den düşük olduğunda sadece früktoz 5-HMF oluşumuna katkıda bulunmuştur. Bu oran 1'den

yüksek olduğunda, hem früktoz hem de glikoz 5-HMF oluşumuna katkıda bulunmuştur. Akrilamidin, asparajin konsantrasyonlarına göre daha yüksek konsantrasyonda indirgen şeker konsantrasyonu içermesi nedeniyle spesifikamino asit yolu ile oluştuğu düşünülmektedir. Fırın bisküvileri sırasında akrilamid ve 5-HMF'ye giden yol, buğday ununda diğer glikoz ve früktoz oranlarına göre farklı olabileceği söylenmiştir (Nguyen ve ark., 2016).

Farklı gıdalarda bulunan akrilamid seviyeleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (Capuano ve Fogliano, 2011). Bu çizelgeye göre ortalama olarak maksimum akrilamid içeriğine sahip gıda ürünü patates cipsidir. Bunu patates kızartması ve ev yapımı patates ürünleri takip etmektedir. Bisküvideki miktar 317 µg/kg'dır. Bu ürünlerin tüketim dozuna dikkat edilmelidir. Tüketim miktarının yüksek olduğu ekmekte akrilamid miktarı 136 µg/kg seviyelerindedir. En düşük değer kavanozlu bebek mamalarında ölçülmüştür.

Çizelge 2.1. Farklı gıdalarda akrilamid seviyeleri ($\mu\text{g/kg}$)^a(EFSA, 2009)(Capuano ve Fogliano, 2011)

Gıda Ürünleri	N ^b	Orta Değer	Ortalama	Maksimum
Bisküvi	227	169	317	4200
Ekmek	272	50	136	2430
Kahvaltılık Tahıl	128	100	156	1600
Tahıl Bazlı Bebek Gıdaları	76	42	74	353
Kahve	208	188	253	1158
Patates Kızartması	529	253	350	2668
Kavanozlu Bebek Gıdaları	84	31	44	162
Diğer Ürünler	854	169	313	4700
Patates Cipsi	216	490	628	4180
Ev Yapımı Patates Ürünleri	121	150	319	2175

^aLOD (ölçülebilen en küçük derişim) 'un LOD altındaki değerler ve LOD ve LOQ (doğruluk ile saptanabilen ölçüm aralığının en küçük derişimi) arasındaki değerler sırasıyla LOD veya LOQ değerine ayarlanmıştır.

^bHer bir gıda kategorisi için analiz edilen bireysel verilerin sayısı

N Ürün gözlem sayısı

2.2.3. Akrilamid ve Sağlık

Akrilamid mutajenik metabolit glisdamide dönüştürüldüğünden ve kemirgenlerde ve insanlarda hemoglobine eklentiler oluşturduğundan, sıçanlardaki tümörjenik uç noktalarının akrilamid genotoksitesinin bir ifadesi olduğu varsayılmıştır. Günde vücut ağırlığının kilogramı başına 1 μg akrilamide yaşam

boyu maruz kaldıktan sonra yaşam boyu kanser tehlikesi, ortalama olarak 1.3×10^{-3} kat arttığı hesaplanmıştır (Dybing ve Sanner, 2013).

Zhang ve ark., (2018) diyet kaynaklarından uzun süre akrilamide (AA) maruz kalmanın oksidatif strese ve kronik inflamasyona neden olabileceği bilgisiyle AA'e maruz kalma ve kardiyovasküler hastalık (KVH) riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmacılar 20-85 yaş aralığındaki 8290 bireyleri çeşitli sınıflara ayırarak AA biyobelirteçlerinin kan maruziyet düzeyleri ile ana KVH görülme sıklığı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bireyler yaş, cinsiyet, sigara içme durumu göz önüne alınacak şekilde gruplara ayrılmışlardır. AA'nın sigara dumanının önemli bir bileşeni olduğu ve sigara kullanımı KVH için önemli bir risk olması nedeniyle analizleri sigara içme anketi ve serum kotinin düzeylerinin bir kombinasyonuna göre, aktif sigara dumanına, çevresel tütün dumanına maruz kalanlar olmak üzere farklı sigara içme durumuna sahip üç grup oluşturulmuştur.

AA hemoglobin biyobelirteçleri [akrilamid (HbAA) ve gliksidamid (HbGA) hemoglobin eklentileri), HbAA ve HbGA (HbAA + HbGA) toplamı ve HbGA'nın HbAA oranı (HbGA: HbAA)] arasındaki ilişkiler analiz edilmiştir. Çevresel tütün dumanına maruz kalan kişilerde ($n = 4670$), HbGA, HbAA + HbGA ve HbGA: HbAA, toplam KVH prevalansı ile anlamlı ve ters ilişkili bulunmuştur. HbAA, KVH riski ile pozitif ilişkili bulunmuştur (Zhang ve ark., 2018).

Ho ve ark., (2002) akrilamidin nöronlar üzerindeki etkisinin altında yatan mekanizmaları, tavuk embriyolarından türetilen kültürlenmiş beyin nöronlarında $GABA_{AR}$ GABA (A) reseptörü (R) ekspresyonunu izleyerek açıklamaya çalışmışlardır. Kültürlenmiş nöronları 3 saat boyunca 10 mM akrilamide maruz bırakmışlardır. Bu maruziyet hücre içi (tripsin dirençli) 3H-flunitrazepam bağlanma bölgelerinin oranını, kontrol grubuna kıyasla % 48 oranında arttırmıştır.

Nöronların hücre gövdelerinde, nörofilament 200 kDa proteinlerinin seviyesi kontrole benzer bulunurken, tübülün proteini içeriği, immüno lekelenmiş hücre iskelet elemanlarının nicelleştirilmesiyle ortaya konulduğu gibi, kontrole

kıyasla yaklaşık % 51 oranında önemli ölçüde azalmıştır. Ek olarak, elektron mikroskopik gözlemlerde, akrilamide maruz bırakılan nöronların perikaryasındakimikrotübül ve nörofilament sayısında azalma bulunmuştur. Akrilamide maruz kalma, kültürdeki genel protein sentezi oranını% 21 oranında inhibe ederken, glikosilasyon oranı değişmeden kalmıştır. Ayrıca, yerinde hibridizasyon analizi, akrilamidin bir alt birim mRNA'ların GABA_{AR} ekspresyonunu değiştirmediğini göstermiştir (Ho ve ark., 2002).

Bu verilere dayanarak akrilamidinmikrotübüler sistemi aşağı regüle edebileceğini ve nörofilamentleri parçalayabildiği ve böylece GABA_{AR}'ın hücre içi naklini bloke ederek hücre içi reseptörlerin birikmesine neden olabileceğiileri sürülmüştür.Bu çalışmada, kültürlenmiş nöronların akrilamide maruz kalması, GABA_{AR}bağlanma bölgelerinin hücre içi fraksiyonunu tersinir şekilde% 48 arttırmış ve ajanın reseptörün toplam yoğunluğunu değiştirmemesine rağmen hücre yüzeyi bağlanmasını % 24 azaltmıştır (Ho ve ark., 2002).

Akrilamid uygulamasının GABA_{AR}'ın hücre içi oranını arttırırken, tubulin proteinlerinin seviyesini ve nöronal perikaryadaki mikrotübül ve nörofilament sayısını azalttığı bulunmuştur. Reseptörün subselüler yeniden dağılımı muhtemelen düşük regüle edilmiş mikrotübüller ve muhtemelen parçalanmış veya düzensiz nörofilamentlerle ilişkili olabilir. Bu çalışma, merkezi sinir sistemindeki majör bir nörotransmitter reseptörünün hücre altı dağılımı üzerindeki çevresel nörotoksinin etkisine dair ilk kanıtları sunmaktadır (Hove ark., 2002).

2.2.4.Akrilamid ve Metabolizması

AA, kimyasal üretim teknolojisinde, boya, kağıt, maden, kozmetik sanayi, araştırma laboratuvarlarında jel hazırlanması, protein ayırma tekniklerinden biri olan elektroforez işlemi ve kirli suların temizlenmesi işlemlerinde kullanılabilmesi nedeniyle geniş kapsamlı endüstriyel kullanımından dolayı içme suyu kaynaklarına karışabilir.Suda hızlı çözünebilirliği ve hareketliliği nedeniyle yüzey ve yeraltı su kaynaklarına yüksek bulaşma riskine sahiptir (Tepe ve Çebi,2019; Yıldız ve ark.,

2010). Gıdalar ile oral yolla, havada akrilamid partiküllerinin varlığında solunum yoluyla ve cilt yoluyla vücuda alınmaktadır (Aktaş, 2008).

Fennell ve ark., (2005)'nın yaptığı bir çalışmada oral uygulamayı takiben insanlarda akrilamid metabolizması incelenmiş, oral ve dermal uygulamada hemoglobin eklentisi oluşumu karşılaştırılmış ve hormon seviyelerini belirlenmiştir. Akrilamid, gönüllülere oral olarak (0.5, 1.0 veya 3.0 mg/kg'lık tek bir doz) veya dermal olarak (günde üç kez 3.0 mg / kg'lık) sulu bir çözelti halinde uygulanmıştır. Oral uygulama için uygulanan gerçek akrilamid miktarı, her denek için 200 ml'deki akrilamid miktarının kg vücut ağırlığı başına hesaplanmasıyla uygulanmıştır. Her doz grubundan bir kişi akrilamid almamıştır. Dermal uygulama ile cilde % 50'lik bir akrilamid çözeltisinin uygun hacmi uygulanmıştır (Fennell ve ark., 2005).

İdrar örnekleri (3 mg/kg oral doz), ^{13}C NMR spektroskopisi kullanılarak akrilamid metabolitleri için analiz edilmiştir. Üriner metabolitlerin yaklaşık % 86'sı glutatyon (GSH) konjugasyonundan türetilmiş ve N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil) sistein ve S-oksit olarak atılmıştır. İdrarda glisdamid, gliseramid ve düşük seviyelerde N-asetil-S-(3-amino-2-hidroksi-3-oksopropil) sistein saptanmıştır. Oral uygulamada, hemoglobin içindeki N- (2-karbamoilet) valin (AAVal) ve N- (2-karbamoil-2-hidroksietil) valin (GAVal) için doğrusal bir doz yanıtı gözlenmiştir. Bu çalışma, insanların glisdamid yoluyla akrilamidi kemirgenlerden daha az oranda metabolize ettiğini ve dermal alımın oral alımda gözlemlenenin yaklaşık % 6.6'sı olduğunu göstermiştir (Fennell ve ark., 2005).

Dermal uygulama ile akrilamid alan beş kişiden dördünde karaciğer enzimi alaninaminotransferazda (ALT) bir artış gözlenmiştir. Cilde uygulandığında, akrilamid, alanin aminotransferaz (ALT) seviyelerinde orta derecede bir artışa neden olmaktadır. Tüm kan parametreleri ve hormon seviyelerinin normal sınırlarda olduğu bulunmuştur. Bu bireyler arasında nörolojik veya kardiyovasküler bulgu gözlenmemiştir. Akrilamidin oral uygulaması üzerine, $^{13}\text{C}_3$ -AAVal ve $^{13}\text{C}_3$ -GAVal seviyeleri doza bağlı bir şekilde artış göstermiştir. Akrilamidin dermal

uygulamasını takiben (gün 1, 2 ve 3), hem AAVa1 hem de GAVa1, her dozdan sonra 2, 3 ve 4. günlerde lineer bir şekilde artmıştır. Bu çalışma, insanlarda akrilamid metabolizmasını ve akrilamid ve glisamid (GA)'nın hemogloblin eklentileri ile oral ve dermal yollarla akrilamide maruz kalma arasındaki ilişkiyi anlamak için yapılmıştır. İnsanlarda metabolizmanın ana yolu, sıçan ve farede gözlemlendiği gibi N-asetil-S- (3-amino-3-oksopropil) sistein oluşturan direkt glutasyon konjugasyonu ve rapor edilmemiş olan S-oksidi olarksaptanmıştır. GA'ya epoksidasyon diğer önemli yoldur, gliseramid insanlarda majör bir metabolit olarak oluşmuştur. İnsanlarda GA (GA ve gliseramidden türetilmiş) yoluyla metabolizma, toplam üriner metabolitlerin yaklaşık % 12'sidir (Fennell ve ark., 2005).

Karagöz'ün (2009) bildirdiğine göre akciğere ulaşan akrilamidin arteriyel kan vasıtasıyla dolaşıma katıldığı, karaciğerde ise epoksitmetaboliti olan glisidamide metabolize olduğu, karaciğerde metabolize olduktan sonra da venöz dolaşıma karıştığı bildirilmektedir. Cyp2E1 (Cytochrom P450 ailya-2 subailya Enzim polipeptit-1) geni tarafından başlatılan reaksiyonla, Sitokrom P 450 metabolizmasına bağı olarak, glutasyontransferaz ve epoksithidrolaz enzimleri vasıtasıyla epoksitmetaboliti olan glisidamide dönüşümü gerçekleşmektedir. Akrilamidin ve metaboliti olan glisidamidinüriner sistemden idrar yoluyla atıldığı belirtilmiştir (Karagöz,2009).

2.3.5-Hidroksimetil-2-Furfural (5-HMF)

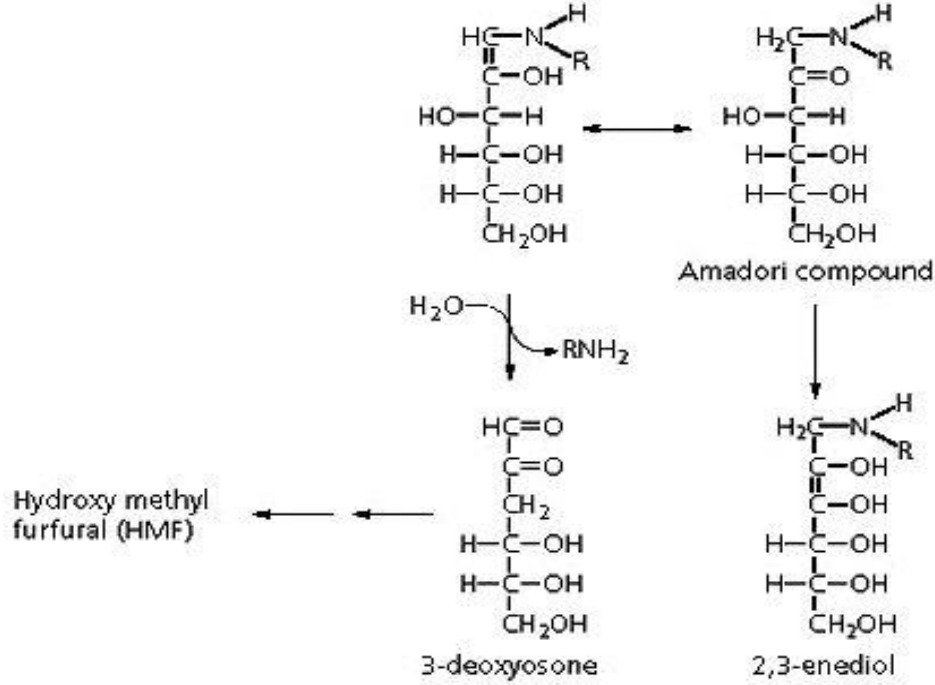
5-hidroksimetilfurfural (5-HMF veya 5- (hidroksimetil) -2-furaldehid), gıdalara uygulanan termal işlemler sırasında belirli koşullar altında oluşan furanik bir ara maddedir. 5-HMF, insan sağlığına zarar vermesi nedeniyle gıdalarda istenmeyen bir bileşiktir. Yüksek 5-HMF konsantrasyonun sitotoksik olduğu ve gözleri, üst solunum yollarını, deriyi ve mukozayı tahriş ettiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Gıdalardaki yaygın olarak bulunuşu nedeniyle, 5-HMF büyük endişe yaratmaktadır (Anese ve ark., 2014). İnsanlar 5-HMF'ye potansiyel olarak ilaç

preparatları, sigara dumanı ve bir dizi yaygın olarak kullanılan içecek ve yiyeceklerin tüketimi yoluyla maruz kalabilirler. 5-HMF, Maillard reaksiyonunda oluşabilen yaygın bir ara üründür (Qing ve ark., 2007). Tahmini alımlar kişi ve gün başına 4 ila 30 mg arasında değişirken, 350 mg'a kadar alımın olabileceği bildirilmiştir (Abraham ve ark., 2011).

2.3.1.5-Hidroksimetil-2-Furfural (5-HMF) Oluşum Mekanizması

5-Hidroksimetil-2-furfural (5-HMF) oluşumu heksoz parçalanması (karamelizasyon) ve Maillard reaksiyonunda ortak ara ürün olan 3- deoksizon üzerinden meydana gelir. Reaksiyon asidik ortamda enolizasyon ile başlayarak enediol denen önemli bir ara ürünü oluşturmasıyla devam eder. Enediolde C=C bağındaki karbonlara bağlı hidroksil grupları bulunur. 1,2-enediolden 5-hidroksimetilfurfural oluşur. Üçüncü karbondan H₂O uzaklaştırılması ile 3-deoksiozon ve ardından C-4'ten H₂O uzaklaştırılması ile 3,4- dideoksiozon-3-en oluştuktan sonra halka yaparak bir hemiasetal meydana getirir ve bu molekülden bir molekül suyun daha ayrılması (C-2) ile 5-HMF oluşur (Saldamlı ve ark., 2014).

Amino asitlerin varlığında ise öncelikle karbonil aminkondensasyonu ile Schiff bazı oluşur. Schiff bazından Amadori ürünü ve buradan da 1,2-enolizasyon ile oluşan 1,2-eneaminol ara ürünü üzerinden H₂O ayrışması ile imin katyonu oluşur. İmin katyonunun hidrolizi ve amin ayrışması ile 3-deoksiozon oluşur. Ardından 3-deoksiozon üzerinden aynı mekanizma ile iki molekül suyun ayrılması sonucu 5-HMF oluşur. Heksozların amino bileşikleriyle kondensasyonu sayesinde enolizasyon ve eliminasyon reaksiyonları nötr pH'ta ve daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir (Saldamlı ve ark., 2014).



Şekil 2.3. 5-HMF'nin oluşumu ve Amadori-yeniden düzenlenmesi
(<http://www.food-info.net/tr/colour/maillard.htm>)

Zhang ve ark. (2019) 5-HMF'yi kantitatif olarak analiz etmek ve oluşum kinetiğini araştırmak amacı ile modeller hazırlamış ve 5-HMF içeriğini HPLC ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada, farklı şeker (Model 1-6), farklı amino asit bileşimlerinin (Model 7-12) ve farklı pH değerlerinin (Model 13-18) 5-HMF oluşumu üzerindeki etkilerini incelemek üzere modeller hazırlanmıştır. Ek olarak, sıcaklık ve reaksiyon süresinin (Modeller 19-24) 5-HMF oluşumu üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Aminoasit içeriğinin 5-HMF oluşumuna etkisini incelemek için aminoasit bileşimi 4 saat 105 °C'de ısıtıldıktan sonra sistein, glutamik asit ve lösinden oluşan modeller oluşturulmuş ve sonuç incelenmiştir.

Glutamik asit ve lösün 5-HMF miktarını artırırken aksine, sisteinin 5-HMF üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuç, glikoz ve sakaroz sisteminde glutamin ve glutamik asit varlığının 5-HMF oluşumunu hızlandırdığını

göstermiştir. Sistein, lizin ve histidin ise 5-HMF'yi tespit edilemeyen seviyelere düşürmüştür. En yüksek 5-HMF konsantrasyonu (0.26 g/kg), sakaroz-glutamik asit model sisteminde (Model 16) pH 3'te saptanmış, pH 7'ye çıkarıldığına ise (0.19 ve 0.05 g kg⁻¹) önemli ölçüde azalmıştır. 5-HMF'nin sükroz varlığında glikozdan daha hızlı oluşmuştur. Bu durumun sükrozun glikosidik bağının, hafif asidik koşullar altında, 5-HMF'nin doğrudan öncüsü olan fruktofuranosil katyonu üretmek için kolayca ayrılabilmesi ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür. Sabit bir reaksiyon süresinde reaksiyon sıcaklığı 90 °C'den 110 °C'ye yükseldikçe 5-HMF oluşumu artmıştır. Maksimum 5-HMF içeriği, 110 °C'lik bir reaksiyon sıcaklığında elde edilmiştir. Ayrıca, sıcaklıktaki kademeli artışla 5-HMF birikimi de artmıştır. En yüksek 5-HMF (0.94 g/kg), sakaroz-glutamik asit modelinde (Model 22) elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2019).

2.3.2. 5-HMF ve Gıda

Czerwonkave ark. (2018) olumsuz etkileribilinen diyetle sıklıkla tüketilebilen alkolsüz içeceklerde 5-HMF içeriğini HPLC ile belirlemişlerdir. Test edilen ürünlerde 5-HMF seviyeleri oldukça değişken bulunmuştur. Verilen değerler sırasıyla minimum ve maksimum değerler olacak şekilde mg/L olarak verilmiştir; kavrulmuş kahvede 85.9 -1574.4, hazır kahvede 854.50 - 6099.30, elma suyunda 1.15-110.75, portakal suyunda 0.47-1.73, domates suyunda 0.52-24.18, Frenk üzümü nektarlarında 0.53-11.15, kola tipi içeceklerde 2.39-40.69, düşükkalorili kola tipi içeceklerde 0.23-6.53, narenciye aromalı alkolsüz içeceklerde 0.45-10.48 mg/L arasında değişmiştir. (Czerwonkave ark., 2018).

Qi ve ark. (2018) kimyasal reaksiyon modellerinde ve kızarmış patates cipsinde flavan-3-ol'lerin 5-HMF oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak, 5-HMF oluşumunun flavan-3-ol ilavesiyle ilişkisini gözlemlemek için bir eş molar asparajin-glikoz modelinde Maillard reaksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla kızartma işlemi gerçekleştirilmeden önce cipsler farklı konsantrasyonlardaki flavon-3-ol çözeltilerine batırılmıştır. Pozitif bir kontrol olarak sistein

kullanılmıştır. Flavan-3-ol üç konsantrasyonda da (50, 100 ve 200 µg/mL) doza bağlı olarak 5-HMF oluşumu üzerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Patates cipsi kızartmadan önce 0.1 mg/mL flavan-3-ols çözeltilerine daldırıldığında maksimum azalma oranı (yaklaşık% 50) elde edilmiş ve cipsin duyuşsal özellikleri üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmamıştır. Kontrol olarak kullanılan sistein ile çok yüksek oranda 5-HMF inhibisyonu elde edilmiştir ancak hoş olmayan bir lezzet oluşmuştur. Aynı kütle konsantrasyonuna dayanarak, B-tipi flavan-3-ol'un A-tipinden 5-HMF azaltmada daha etkili olduğu ve oligomerik proantosiyaniidinlerin, polimerlerden daha güçlü inhibitör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, daha geniş bir alana ulaşması için kurabiye ve ekmek gibi diğer gıdalardaki inhibitör mekanizma ve uygulamaları incelemek için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (Qi ve ark., 2018).

Çizelge 2.2.'de sıklıkla tüketilen gıda ürünlerindeki 5-HMF miktarları belirtilmiştir. Buna göre kahve yüksek miktarda 5-HMF içermektedir. Üzüm şırası elde edildikten sonra uzun süre pişirilerek meydana gelen balsamik sirke uzun süre pişmenin ve bekletilmenin etkisiyle çok yüksek miktarda 5-HMF içermektedir. Tahıl ürünlerden kahvaltılık tahıllar, kurabiye ve ekmek 5-HMF içeriği yönüyle tüketim dozu dikkatli olunması gereken ürünlerdendir. Bebek mamaları ve bebek mamalarından tahıl bazlı bebek mamaları 5-HMF içeriği ile dikkat çeken ürünlerdendir.

Çizelge 2.2. Çeşitli gıdalarda 5-HMF seviyeleri (Capuano ve Fogliano, 2011)

Gıda Ürünleri	5-HMF İçeriği (mg/kg)
Kahve	100–1900
Kahve (hazır)	400–4100
Kahve (kafeinsiz)	430-494
Malt	100–6300
Bal	10.4–58.8
Bira	3.0–9.2 ^a
Reçel	5.5–37.7
Meyve suyu	2.0–22.0
Kırmızı şarap	1.0–1.3 ^a
Kurabiye	0.5–74.5
Beyaz ekmek	3.4–68.8
Tost ekmeği	11.8–87.7
Kahvaltılık tahıllar	6.9–240.5
Bebek maması (süt bazlı)	0.18–0.25
Bebek maması (tahıl bazlı)	0–57.18
Kuru meyve	25–2900
Sirke	0–21.5 ^a
Balzemik sirke	316.4–35,251.3 ^a

^a : mg/mL

2.3.3. 5-HMF' nin Metabolizması

Akıllıoğlu ve ark. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* tarafından fermantasyon sırasında 5-HMF'nin malt içindeki bozunma kinetiğini araştırmışlardır. 5-HMF, kavurma koşullarına bağlı olarak malta yüksek miktarlarda ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte, farklı bira türlerinin 5-HMF içeriğinin farklı olması fermantasyon sırasında bozunma potansiyelini de göstermektedir. Sonuçlar fermantasyon ilerledikçe 5-HMF'nin katlanarak azaldığını göstermiştir. 5-HMF'nin hidroksimetil furfuril alkole dönüşümü maya hücrelerinin birincil aktivitesi gibi görünmektedir. Fermantasyon ortamında şeker varlığı bu aktiviteyi arttırmaktadır. Şeker konsantrasyonundaki azalma mayaların birincil aktivitesini göstermektedir.

Fermantasyon sırasında glikoz ve früktozun yanı sıra 5-HMF'nin de parçalandığı ve bunun glikoz veya früktozdan daha hızlı olduğu gözlenmiştir. Fermantasyon ortamında şeker olduğunda 5-HMF bozulması daha hızlı gerçekleşmiştir. Benzer şekilde, koyu kavrulmuş malt durumunda şeker bozulma oranı daha yüksek bulunmuştur. Fermantasyon sırasında 5-HMF, furfuril alkole dönüşmüştür. Ayrıca, fermantasyon sırasında yaşayabilir hücre sayısında bir azalma bulunmamıştır ve 24 saatlik fermantasyondan sonra maya sayısı 5-HMF varlığında daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın genel sonuçları maya fermantasyonunun fermente ürünlerdeki 5-HMF'nin hafifletilmesi için yararlı bir strateji olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, hidroksimetilfurfuril alkolün toksisitesi hakkında bilgi eksikliğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Akıllıoğlu ve ark.,2011).

Erkek F344 sıçanlarında ve B₆C₃F₁ farelerinde, metabolik aktivasyonu daha fazla araştırmak ve 5-HMF toksikoloji çalışmalarına bilgi sağlamak için radyoaktif işaretli [¹⁴C] - 5-HMF 5, 10, 100 ve 500 mg/kg konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Çalışmada ağırlıkları 225 g olan 11 sıçan 11 ve 25 g ağırlığındaki 5 haftalık fareler kullanılmıştır. Sıçanlar ve fareler için sırasıyla 4 mL/kg ve 10 mL/kg dozlar uygulanmıştır. 5-HMF verilen fare veya sıçanlardan

alınan idrar örneklerindeki 5-hidroksimetil-2-furoil-glisin-(5-HMFG), 5-hidroksimetil-2-furoik asit (5-HMFA) ve 2,5-furandikarboksilik asit (FDCA)HPLC’de belirlenmiştir. Her iki canlıda da atılım esas olarak idrar yoluyla olmuş ve verilen dozun % 60-80’i 48 saat içinde atılmıştır. 5-hidroksimetil-2-furfuralın erkek B6C3F1 farelerinde ve F344 sıçanlarında gastrointestinal sistemde hızla emildiğini ve en erken erkek farelerin dokularında emildiği saptanmıştır (Godfrey ve ark., 1999).

2.3.4. 5-HMF Nin Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri

Florian ve ark. (2012) ısıtılmış sakarozun 5-HMF'nin aktif bileşen olarak tanımlanmasının ardından, sıçan ve fare kolonunda azoksimetan ile başlatılan anormal kript odaklarının (ACF) oluşumunu başlatmasıyla, Maillard ürünü 5-hidroksimetilfurfuralın, elektrofilik ve mutajenik bir metaboliti olan 5-sülfoksimetilfurfuralın (SMF) iki murin modelinde ACF indükleyip indükleyemeyeceğini araştırmışlardır. İlk modelde, FVB/N farelerine dört intraperitoneal SMF (62.5 veya 125 mg / kg) veya azoksimetan (10 mg/kg) verilmiştir. Azoksimetan ile tedavi edilen gruplarda (20 hayvan) toplam 1064 ACF ve beş adenokarsinom tespit edilmiş, ancak negatif kontrol ve SMF ile tedavi edilen gruplarda hiçbirisi tespit edilmemiştir.

İkinci modelde 5-HMF, vahşi tip FVB/N farelerine ve insan sülfotransferaz (SULT) 1A1 ve 1A2 genlerinin birkaç kopyasını taşıyan transgenik farelere içme suyu yoluyla uygulanmıştır. Hayvanlara (grup başına altı) 12 hafta boyunca her gün 134 ve 536 mg 5-HMF/kg verilmiştir. 5-HMF SULT aktivitesi, kolon tipi mukoza, karaciğer ve böbrek transgenik hayvanların sitosolik fraksiyonlarında, vahşi tip farelere ve insanlara kıyasla açıkça yükselmiştir. 5-HMF, vahşi tip veya transgenik hayvanlarda herhangi bir ACF indüklememiştir. Son çalışmada, 5-HMF'nin - yani, hayvanlara azoksimetan ile önceden muamele edilmeden - sıçan kolonunda artan sayıda ACF indükleyebildiği de bildirilmiştir. Bu lezyonların başlatılması, kolon mukozasında gen mutasyonlarının uyarıldığının göstergesi

olmuştur. Bulgular, fare ve sıçanlarda uzun dönemli bir çalışmanın olumsuz sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (Florian ve ark., 2012).

Sülfotransferaz (SULT) 1A1 geni ksenobiyotikbileşliklerin faz II metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir. Sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve arilaminler gibi bazı kanserojen maddelerin sülfasyon reaksiyonlarını katalizlediği bilinir (Özer ve ark., 2014). Bu çalışmada araştırmacılar sülfotransferaztarafından biyolojik olarak aktif hale getirilen 5-HMF'ningenotoksik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu düşüncelerini değerlendirmek amacıyla insan kökenli iki hücre hattı (Caco-2, düşük aktivite; ve HEK293, daha yüksek aktivite), fare kökenli bir hücre hattı (L5178Y, aktivite yok), Çin hamsteri kökenli iki hücre hattı (V79, ihmal edilebilir aktivite; ve V79-hP-PST, insan SULT1A1'in yüksek aktivitesi) 100 mM 5-HMF'ye 3 saat maruz bırakıldıktan sonra tüm hücre hatlarında önemli DNA hasarı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu konsantrasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bulunacak şekilde azalma gözlemlenmiştir (Durlingve ark.,2009).

5-HMF, baldaki ısı ve depolama değişikliklerinin bir göstergesi olarak kullanılır. Bal, kristalleşmeyi geciktirmek, kontaminant mikroorganizmaları uzaklaştırmak, viskoziteyi azaltmak ve kristalleşmeyi ve fermantasyonu önlemek için termal işlemlere tabi tutulabilmektedir. Bu işlemler balın 5-HMF içeriğinin artmasına neden olabilmektedir. Özkök ve Silici (2016) yaptıkları çalışmada, yüksek 5-HMF içeren bal içeriğinin sıçanların biyokimyasal parametreleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma boyunca içme suyu ve pelet yemi hayvanların tüketebildiği miktar ölçüsünde verilmiştir. Hayvanlar, kararlı koşullar altında 22-24°C'de ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde barındırılmıştır. Deneyler, her biri 250-350 g ağırlığında ve 5 haftalık bir dönemi kapsayan 40 Wistar albino erkek sıçan ile gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar beş gruba ayrılmıştır. Grup 1, kontrol; grup 2, 5-HMF 70 mg 5-HMF/kg; grup 3, 10 mg 5-HMF/kg bal (Normal 5-HMF bal: NH); grup 4, (Depolanmış bal: SH) 181 mg 5-HMF/kg bal; grup 5,

(Isıtılmış bal: HH) 140 mg 5-HMF/kg bal içeren ballar olarak gruplandırılmıştır (Özkök ve Silici, 2016).

Gruplara ayrılan ratlar bu içerikteki ballarla 5 hafta süre ile beslenmiştir. Besleme işleminin sonunda, sıçanların biyokimyasal kan parametreleri araştırılmıştır. Grupların glikoz, trigliserit, HDL kolesterol, ürik asit, Na, GGT ve ALP parametreleri arasında fark olmadığı gözlemlenmiştir. Öte yandan, sıçanların kolesterol, LDL, BUN, kreatinin, Ca, P, Mg, K, Cl, toplam bilirubin, LDH, CPK, AST, ALT, toplam protein ve psödokolinesteraz değerleri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek yan etkiler grup 5-HMF'den elde edilmiştir ve bunu SH (depolanmış bal) ve HH (ısıtılmış bal) takip etmiştir. Bu sonuçlardan balın yüksek 5-HMF içeriğinin insan sağlığını olumsuz etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Özkök ve Silici, 2016).

2.4.4-Metilimidazol (4-MeI)

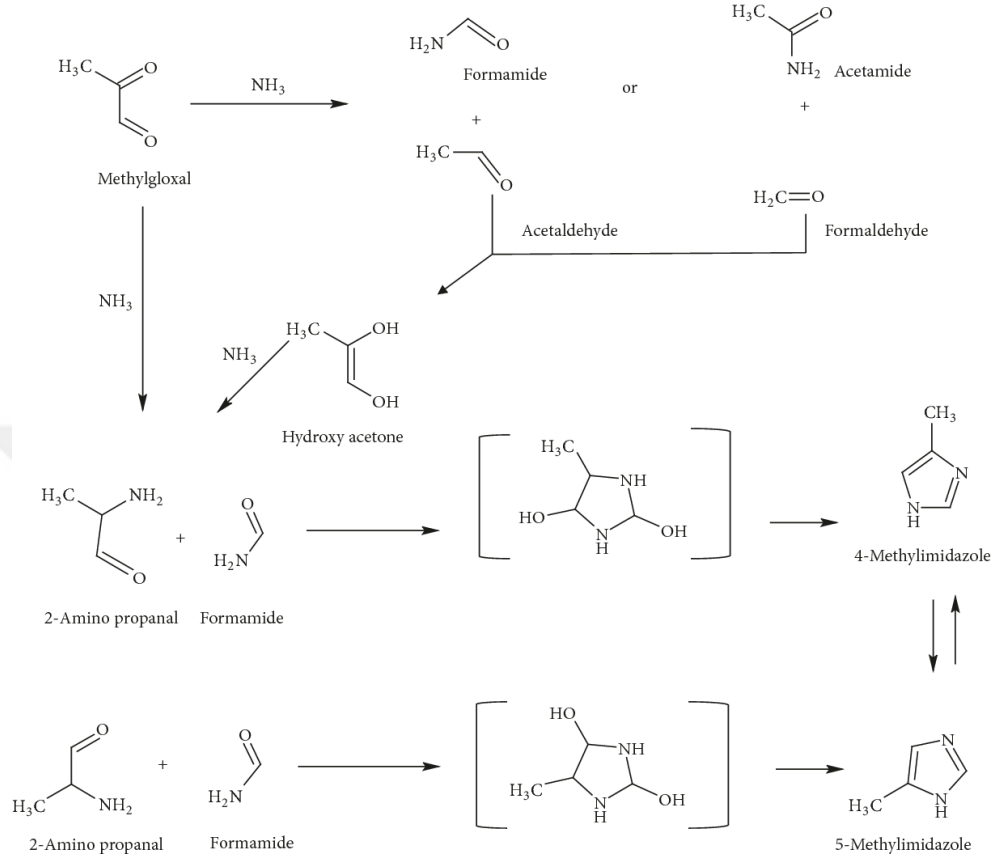
Karamel renkleri, AB'de gıda katkı maddesi olarak onaylanan renklendirici maddelerdir ve imalatlarında kullanılan reaktanlara göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır: Sınıf I Düz Karamel veya Kostik Karamel (E 150a); Sınıf II Kostik Sülfid Karamel (E 150b); Sınıf III Amonyak Karamel (E 150c) ve Sınıf IV Sülfid Amonyak Karamel (E 150d). 4-MeI, hem Sınıf III Amonyak Karamelinin hem de Sınıf IV'ün üretiminde kullanılan amonyak işlemi sırasında oluşan kimyasal bir reaksiyon olan amonyak azaltıcı şekerler ile etkileşimi ile oluşur. 2008 /128/ EC Komisyon Direktifi uyarınca bu karamel renklerinde maksimum 4-MeI seviyesi < 250 mg / kg ile sınırlı olduğu bildirilmiştir. 4-MeI için ADI (Allowed Daily Intake-İzin Verilen Günlük Alım) değeri 300 mg/kg olarak belirlenmiştir (EFSA Journal 2011).

Karamel rengi veren katkıları, gıda endüstrisindeki en ünlü katkı maddelerinden biridir (Wu ve ark., 2016). 4- MeI karamel renkli gıdalarda, soya sosu, şarap, pekmez ve karamel renkli şuruplar dahil olmak üzere çeşitli gıda ürünlerinde ana akım ve yan akım sigara dumanında amonyaklı yemle beslenen

ineklerden elde edilen sütte saptanmıştır. Amonyaklı samanla beslenen koyunda yüz seğirmesi ve genel vücut titremeleri, ardından intravenöz olarak indüklenen öksürük, tükürük, idrara çıkma gözlenmiştir (Chan, 2008). IARC 4-MeI'ü insan için muhtemel kanserojenik 2B olarak sınıflandırmıştır (Saldamlı ve ark.,2014).

2.4.1. 4-Metilimidazol (4-MeI) Oluşum Mekanizması

4-MeI'ün gıdalarda oluşumu hakkında yeterli ve kesin bilgi bulunmamaktadır. 4-MeI oluşum mekanizması büyük olasılıkla, reaktif karbonil (glukoz, früktoz ve maltoz, vb.), dikarbonil bileşiklerinin ve amino asitler (veya amonyak bileşikleri) arasındaki Maillard reaksiyonundan kaynaklanır. Son yıllarda, Maillard reaksiyonunda 4-MeI'nın, hiperglisokal (MGO), formaldehit ve amonyak reaksiyonundan kaynaklanmaktadır (Wu ve ark., 2016). Metilglükosalin amonyak ile ve hidroksiasetonun amonyak ile reaksiyonundan 2-aminopropanal üzerinden 4-MeI oluşumu olduğu görülmektedir (Saldamlı ve ark., 2014). Şekil 2.4'te metilglisokalden 4-metilimidazolün önerilen oluşum mekanizmaları anlatılmıştır.



Şekil 2.4. Metilglisokalden 4-metilimidazolün önerilen oluşum mekanizmaları(Wieczorek ve ark., 2018)

Moon ve Shibamoto (2011), D-glikoz/ NH_3 , L-ramnoz/ NH_3 , metilglikokal/ NH_3 ve metilglikoksal/formaldehit/ NH_3 'ten oluşan Maillard reaksiyon modeli kurmuşlardır. Deneyi kurmak amacıyla marketlerden satın alınan kola kullanılmıştır. Standart, 4-metilimidazol (10 mg/L) stok çözeltisi, HPLC derecesindeki su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Çözelti en az 1 hafta boyunca karanlıkta 4°C 'de stabil tutulmuştur. 30 mL sulu D-glikoz (0.1 M) ve amonyum hidroksit (0.1 M), L-ramnoz (1 M) ve amonyum hidroksit (1 M), metil glikoksal (1 M) ve amonyum hidroksit çözeltileri içeren bir döner şişe (1 M), metil glikoksal (1 M), formaldehit (1 M) ve amonyum hidroksit (1 M) 30 dakika

boyunca bir buz banyosunda soğutulmuştur. D-glikoz ve amonyum hidroksit çözeltileri, bir fırında 3, 6 veya 12 saat boyunca 70, 100 veya 120 °C'de ısıtılmıştır. L-ramnoz ve amonyum hidroksit, metil glioksal ve amonyum hidroksit veya metil glioksal, formaldehit ve amonyum hidroksit çözeltileri 100 °C'de 2 saat bir fırında ısıtılmıştır. Numuneler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, reaksiyon numuneleri 50-250 kat su ile seyreltilmiştir. Her numune (20 µL), 4-metilimidazol analizi için LC-MS içine enjekte edilmiştir. 9 farklı örnekte 70-120 °C arasında değişen sıcaklıklarda 3-12 saat arasında değişen ısıtma süreleriyle 4-metilimidazol oluşumu araştırılmıştır.

Glikoz degradasyon ürünlerinden biri olan metilglikoksalın amonolizinin, daha sonra 4- veya 5-metilimidazol verecek şekilde metilglikoksalden oluşan 2-aminopropanal (R-aminokarbonil ara maddesi) ile reaksiyona sokulduğu formamit oluşturması düşünülmüştür. 4-metilimidazol, D-glikoz / NH₃ model sisteminde 0.49 ila 0.71 mg / mL arasında değişen seviyelerde olduğu analiz edilmiştir. 4 -metilimidazol oluşumu L-ramnoz / NH₃ sisteminde biraz daha yüksek bulunmuştur (0.91 mg / mL), reaksiyona formaldehit eklenmesi 4-MeI miktarını çok fazla etkilememiştir. Bir metilglikoksal / NH₃ sistemi, önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde 4 (5) -metilimidazol (5.70 mg / mL) üretmiştir, bu da metilglikoksalın 4-metilimidazolün önemli bir öncüsü olduğunu gösterdiği sonucuna varmışlardır (Moon ve Shibamoto, 2011).

Jang ve ark., (2013) tek başına sukrozdan ve bir D-glikoz / amonyak Maillard model sisteminden oluşan glikoksal, metilglikoksal ve diasetili, gaz kromatografisiyle analiz etmişlerdir. Genel olarak bulunan a-dikarbonilbileşiklerinin miktarları, farklı pH değerlerinde değişiklik göstermiştir. Glikoksal ve metilglikoksal asidik koşullarda bazik koşullara göre daha fazla oluşurken, diasetil en yüksek pH 12 de oluşmuştur. Metilglikokal, 4 saatlik ısıtmadan sonra önemli ölçüde azalmıştır. Ancak bu sonuç uzun süre ısıya maruz kalması nedeniyle bozunduğunu düşündürmüştür. En yüksek toplam a-dikarbonil oluşumu (282.36 µg /g) pH 2, 120 °C ve 2 saat koşullarında görülmüştür.

Bu sonuçlar, bu koşullar altında şekerin bozulması için açık bir kural olmadığını, ancak genel olarak oluşan bazı α -dikarbonil bileşiklerinin uzun süreli ısıtma işlemi sırasında bozulabileceğini göstermiştir (Jang ve ark., 2013).

Sülfite, özellikle karamel rengi IV olarak adlandırılan ve yaygın olarak kullanılan karamel rengi IV üretmek için kullanılmıştır. Bu nedenle sülfite, 4-MEI oluşumunun bastırılmasında ve ayrıca tercih edilen renklerin elde edilmesinde kullanışlı olabilir. Alkolsüz içeceklerde karamel rengi hazırlamak için yaygın bir uygulama olan bir sülfite ilavesi, bir aldehit-sülfite ilavesinin oluşumu nedeniyle 4-MEI oluşumunu azaltır. Sülfite ilavesi, grup I'de (0.1 M) glioksal oluşumunu % 57, % 93 metilglikokalde diasetil oluşumunu % 78 azaltmıştır; grup II'de (0.5 M) % 50 oranında glioksal, % 90 oranında metilglikoksal ve % 87 oranında diasetil ve grup III'te (1.0 M) % 33 oranında glioksal, % 67 oranında metilglikoksal ve % 80 oranında diasetil azalışına neden olmuştur (Jang ve ark., 2013).

Genel olarak, üç α -dikarbonil bileşiğinin tamamı sülfite ilavesiyle indirgenmiştir. Sonuçlar, sülfite ilavesinin α -dikarbonil bileşiklerinin oluşumunu azalttığını açıkça göstermektedir. Amin bileşiği şeker degradasyonunda önemli bir rol oynar. Maillard reaksiyon sistemlerinde α -dikarbonil bileşikler oluşturmak için şekerlerin degradasyonu üzerinde etkilidir. Şeker bozulmalarında Schiff bazı oluşumu yoluyla bir katalizör olarak bir amino grubu önerilmiştir. Örneğin, 7 gün boyunca 50 °C'de ısıtılan bir glikoz/lizin tampon çözeltisinde 11 α -dikarbonil bileşiği tanımlanmıştır. Ayrıca, karamelizasyon ve Maillard reaksiyonu üzerine D-glikoz dahil farklı karbonhidratlardan glioksal ve metilglikoksal oluşumunda amino asitlerin katalitik aktivitesi gözlemlenmiştir (Jang ve ark., 2013).

Karamel rengi hazırlamak için yaygın bir uygulama olan sülfite ilavesi, bir aldehit-sülfite eklentisinin oluşumu nedeniyle 4-MEI oluşumunu azaltmaktadır. Şeker içeren normal içeceklerin, şekerli olanlardan çok daha yüksek seviyelerde glioksal ve metilglikoksal içermektedir. Bu çalışma, glioksal, metilglikokalde diasetilin bir şekerden oluştuğunu ve daha sonra Maillard reaksiyon sistemlerinde 4-MEI ürettiğini göstermiştir. Bu çalışmada araştırılan

kimyasalların deney hayvanlarında tümör oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Jang ve ark., 2013).

2.4.2. 4-Metilimidazol' ün Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri

Motoi ve ark. (1997) 10 erkek Holstein buzağılarını (Siyah Alaca, 2 saat ile 12 günlük) yüksek şeker içeriğine sahip taze samanla beslemiş, kolostrumları (test sütü), 4-MeI ilave edilen kolostrum(4-MeI sütü) ve 4-MeI içermeyen normal kolostrum (kontrol) ile karşılaştırmışlardır. Süt tüketimini takiben merkezi sinir sistemi bozukluğunun semptomları, elektrokardiyogram (EKG), işitsel beyin sapı yanıtı (ABR), hematolojik ve kan kimyası profilleri ile analiz edilen kalp fonksiyonu gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre iki buzağı ateşli, aşırı uyarılabilir hale gelmiş ve test sütü tüketildikten sonraki 2 gün içinde anormal davranış sergilemişlerdir.

4-MeI sütü verilen altı buzağıdan dördü benzer belirtiler göstermiş ve ABR'nin benzer bir şekilde ortadan kalktığını göstermişken, iki yaşlı buzağıda (6 ve 12 gün) ateş görülmemiş ve anormal davranış veya anormal ABR sergilememiştir. Neredeyse tüm deneysel buzağılar, hastalığın başlangıcına denk gelen kan piruvat ve laktat konsantrasyonlarında bir artış göstermiştir. Diğer kan bileşenlerinde kayda değer bir değişiklik saptanmamıştır. Patolojik değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular buzağı yaşının bir bileşiğin toksisitesi ile ilişkili olduğunu ve bu nedenle bu deneyde 4-MeI sütü veya test sütü tarafından indüklenen klinik belirtilerin karşılaştırmasını etkilediğini göstermektedir (Motoi ve ark., 1997).

50 erkek ve 50 dişiden oluşan F344 / N ratları ve B₆C₃F₁ fareleri 106 hafta boyunca erkekler için 0, 625, 1250, 2500ppm; dişiler için 0, 1250, 2500, 5000 ppm oranlarında 4-MeI içeren diyetlere maruz bırakılmışlardır. Gıda tüketimine bağlı olarak, hesaplanan ortalama günlük dozlar erkekler için vücut ağırlığının yaklaşık 30, 55 ya da 115 mg 4-MeI / kg ve dişilere 60, 120 ya da 250 mg 4-MeI/kg günlük dozlara eş değer olacak şekilde ayarlanmıştır. Her hayvan için 40'tan fazla

bölgeden alınan dokular incelenmiştir. Bu çalışmanın sonunda erkek ve dişi farelerde alveol adenom ve karsinomunun arttığı gözlemlenmiştir. 4-MeI'e maruz kalan dişi ratlarda kontrolden daha fazla lösemi oranı gözlenmiştir. 2500 ve 5000 ppm'deklonik nöbetler, uyarılabilirlik, hiperaktivite ve bozulmuş yürüyüş gözlemlenmiştir (NTP, 2007).

2.4.3.4-Metilimidazol ve Gıda

Smith ve ark. (2015) 4 –MeI'a maruz kalma değerlendirmesi yapabilmek amacıyla New York ve Kaliforniya marketlerinden rastgele aldıkları bazı meşrubat çeşitlerinde 4–MeI miktar analizi yapmışlardır. Bu analizlerin sonuçlarına göre meşrubatların ortalama ve maksimum 4 –MeI miktarları sırasıyla şu şekildedir: 365 diyet soda 61,1 µg/L ve 163 µg/L, A&W Root Bira 65µg/L ve 69,8µg/L, enerji içeceği 46,5µg/L ve 48,2µg/L, diyet Coca Cola 9,83µg/L ve 10,4µg/L, normal Coca Cola 11,7µg/L ve 12,6µg/L, zeroCoca Cola 10,26 µg/L ve 11,9µg/L, Dr.PepperRegular 27,9µg/L ve 30 µg/L, Goya Malta 941,5µg/L ve 1104µg/L, diyet Pepsi 191,4µg/L ve 550µg/L, PepsiOne 289,3µg/L ve 750µg/L, normal Pepsi 183,5µg/L ve 556µg/L, Sprite belirleyici limitin altında değerler elde etmişlerdir (Smith ve ark., 2015).

Moonve ark. (2011) 4-MeI'ü sos ve kahve için, 0.3 ile 3 ppm arasında, çeşitli karamel numunelerinde 7 ile 200 ppm arasında değişen seviyelerde tanımlanmıştır. Alkolsüz içeceklerden kolada 0.30 µg/mL ile 0.36 µg/mL arasında 4-MeI seviyesi tespit edilmiştir. Kahveler ve biralar, sırasıyla 0.39 µg/g (Meksika) ile 2.05 µg/g (Vitmelta) ve 1.58 ng/mL (Velkopopovickykozel) ile 28.03 ng/mL (Starobno) arasında değişen seviyelerde 4-MeI içermektedir. Sonuçlar koladaki 4-MeI seviyelerinin kahvedekine benzer olduğunu göstermiştir.

Çizelge 2.3'te karamellerin sınıflandırılmalarına göre ısı türevi bileşenlerin oluşumu gösterilmektedir. Sınıf I düz karamel veya kostik karameli; sınıf II kostik sülfid karameli; sınıf III amonyak karameli ve sınıf IV sülfid amonyak karameli ifade etmektedir. Bu çizelgeye göre 5-HMF ve furanın sınıf I, II, III ve IV'te

oluştugu görülmektedir. Akrilamid oluşumu dört sınıfta da gözlemlenmemiştir. 4-Mel sınıf III ve IV'te görülmüştür.

Çizelge 2.3. Endüstri tarafından sağlanan verilere göre karamel sınıf I, II, III ve IV'te ısı türevi bileşenlerin oluşumu (EFSA, 2011)

	Sınıf I	Sınıf II	Sınıf III	Sınıf IV
5-HMF	700 – 27 300 mg/kg (n = 9)	3300 – 33 700 mg/kg (n = 18)	10 – 3900 mg/kg (n = 40)	4900– 21 400 mg/kg (n = 90)
Furan	151 µg/kg (n = 1)	52 µg/kg (n= 1)	177 µg/kg (n = 1)	Maksimum: 59 µg/kg (n = 28)
4-Mel	Veri yok	Veri yok	5 - 140 mg/kg (n = 103)	Tek güç: 48-183 mg/kg (n=35) İki kat güçlü: 23-147 mg/kg (n = 152)
Akrilamid	Veri yok	Veri yok	Tespit edilmedi (tespit limiti = 100 µg/kg) (n = 1)	Tespit edilmedi (tespit limiti = 1 µg/kg) (n = 16)
Diğer furan-, piridinler-, pirazinler- ve imidazol türevleri	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok

2.4.4.4-Metilimidazol ve Metabolizması

Gıdaların ısıtılması işlemi nedeniyle oluşan 4-MeI, kanser biyoanalizlerinde, farelerde akciğer tümörlerini indüklemiş, ancak sıçanlarda bu durum gözlenmemiştir. Fennell ve ark. (2019), sıçan ve farelerde akciğer ve karaciğer mikrozomları ve S-9 fraksiyonlarında *in vivo* metabolizmayı araştırmayı amaçlamıştır. Erkek ve dişi F-344 sıçanlarına ve B6C3F1 farelerine gavaj yoluyla 50 ve 150 mg/kg [14C] 4-MeI uygulanmıştır. Genel olarak, 4-MeI'nin metabolizması sıçanlar ve fareler arasında benzer bulunmuştur. Sıçan veya fare akciğeri ve karaciğer mikrozomları veya akciğer S-9 fraksiyonlarında hiçbir metabolit saptanmamıştır. 4-MeI, sınırlı oksidatif metabolizma ve konjugasyon ile sıçanlarda ve farelerde değişmeden atılmıştır. Eliminasyon esas olarak idrar yoluyla olmuştur.

Sıçanlarda idrarda % 79-89 ve farelerde % 41-70 oranında 4-MeI bulunmuştur. İdrardaki radyasyon etkinliğinin çoğu (%71-88) değişmemiş 4-MeI'dür. Ek radyoaktif pikler (en büyük metabolit % 8-18) LC-MS/MS ile 4 hidroksimetilimidazol, glukuronid ve metilhidantoin dahil olmak üzere diğer oksitlenmiş ürünler olarak karakterize edilmiştir. 14-C etiketli üre yaklaşık %2 2-metilhidantoin asitin tanımlanması, 4-MeI'nin bu türlerde halka açılmasına neden olan metabolizmaya uğrayabileceğini göstermiştir. Spesifik oksidasyon ürünlerini tanımlamak için 5-metilhidantoin ve metilhidantoin asit oluşumu belirlenmiştir. Metilhidantoinin, 4-MeI uygulamasının bir sonucu olarak artmadığı görülmüştür (Fennell ve ark., 2019)

Dozlamadan önce ve dozlamadan sonra sıçan ve farelerin idrarında 2-metilhidantoin asit tespit edilmiştir. 2-Metilhidantoin asitte, 4-MeI uygulanmış doz ile küçük bir artış olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 2-metilhidantoin asidin geri kazanımı, idrar radyoaktivitesinin yaklaşık %1 veya daha azı ile tutarlı bulunmuştur (Fennell ve ark., 2019).

FMO'lar birkaç formda eksprese edilir ve akciğer, karaciğer, böbrek ve bağırsak dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilir. Molibden içeren

hidrolazlaraldehidoksidaz ve ksantinoksidazı içerir. Aldehit oksidaz, nitrojen inheterosiklik halkalara bitişik karbonun oksidasyonunda büyük ölçüde rol oynar. Alkol dehidrojenazın rekabetçi inhibisyonu ile alkol metabolizmasının bir inhibitörü olan 4-metilpirazolün metabolizması, metil grubunun 4-hidroksimetilpirazoleksidasyonu ve 4-karboksipirazole oksidasyon yoluyla metabolizmayı açıklar (Fennell ve ark., 2019).

Sonuç olarak, 4-MeI, erkek ve dişi farelerde ve sıçanlarda (ürinerradyoaktivite durumunda % 60 ile % 78 arasında) değişmeden idrarla atılmıştır. *Invitro* çalışmalarda metabolitler saptanmamıştır ancak *invivo* çalışmalarda, idrar radyoaktivitesinin% 22-40'ını oluşturan hidroksillenmiş 4-MeI ve glukuronidleri içeren çeşitli metabolitler tespit edilmiştir. Fareler ve sıçanlar arasında 4-MeI'ün metabolizmasında ya da 4-MeI'ün klirensinde ve 4-MeI'ün karsinojenik aktivitesinde rapor edilen farelerde olup ancak sıçanlarda olmayan farklılıkları açıklayabilen önemli farklar görülmemiştir(Fennell ve ark., 2019).



3.MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

Analizler sırasında kullanılmış olan kimyasal maddeler 5-hidroksimetilfurfural ve 4-metilimidazol Sigma Aldrich, akrilamid Merck firmasından temin edilmiştir. Kullanılan besiyerleri MRS broth, MRS agar, nutrient broth, nutrient agar Merck, boş ve antibiyotikli diskler Bioanalysefirmasından temin edilmiştir. Mikroorganizmalar *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği mikrobiyoloji laboratuvarı ve Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümü laboratuvarından temin edilmiştir. *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Proteus* sp., *Pantoea* sp., *Yersinia* sp. bakterileri doğal izolat olup Vitek-2 kompakt sistemi ile tanımlanmışlardır.

3.2.Metot

3.2.1. 5-Hidroksimetilfurfural (5-HMF), Akrilamid ve 4- Metilimidazolün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Antimikrobiyel etkinin belirlenmesinde Disk Difüzyon Yöntemi ve Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon Yöntemi (MİK) kullanılmıştır.

3.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 5- Hidroksimetilfurfural (5-HMF), akrilamid ve 4-metilimidazol kimyasallarının çözeltilerinin *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* bakterileri üzerindeki antimikrobiyel etkinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır.

Kullanılan konsantrasyon miktarları 5-HMF için; 0,05 g/mL , 0,025 g/mL, 0,0125 g/mL, 0,00625 g/mL, 0,00312 g/mL; akrilamid için; 0,4 g/mL, 0,2 g/mL, 0,1 g/mL, 0,05 g/mL, 0,025 g/mL ve 4-MeI için; 0,05 g/mL, 0,025 g/mL, 0,0125 g/mL, 0,00625 g/mL, 0,00312 g/mL'dır.

Araştırmada kullanılmış olan bakteriler tek koloni eldesi amacıyla *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp. steril edilmiş nutrient agar besiyerine, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* MRS agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrasında tek koloni eldesi sağlanan *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp. steril edilmiş 5 mL nutrient broth besiyerine, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* 5 mL MRS broth besiyerine aktararak 37°C'de 24 saat süreyle bırakılmıştır. Elde edilen inokulum süspansiyonunun yoğunluğu 0,5 McFarland standardına eşit olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 100 µL alınarak her bakteriye deneylerin başından itibaren kullanılmış olan besiyeri içeren petri kutularına drigalski spatülü yardımıyla yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra 0.5 cm çapındaki diskler petri kutularına her bir petri için 3 adet olacak şekilde besiyerinin yüzeyinde oluşacak zonların birbirine değmeyeceği uzaklıklarda olacak şekilde pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Her bir diske çözelti halindeki akrilamid, 5-HMF ve 4-MeI belirlenen konsantrasyonlarda 30 µL emdirilmiştir. Aynı petri kutusundaki zon çaplarının çakışmaları durumunda deneme farklı petri kutusunda kullanılarak üç paralelli tekrar edilmiştir. Daha sonra, petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşan ve inhibisyonun meydana geldiği zonlar ölçülerek mm cinsinden verilmiştir. Karşılaştırma amacıyla 10 µg amfisilin, 30 µg kloramfenikol ve 10 µg streptomisin içeren antibiyotik diskleri kullanılmıştır (Jayari ve ark., 2017; Yıldırım ve ark., 2003; Yin ve Tsao 1999).

3.2.3. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon Yöntemi

Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak gelişiminin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyel maddekonsantrasyonu “Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)” olarak belirlenir.

MİK analizi için değişen konsantrasyonlarda akrilamid için 5-HMF için; 0,05 g/mL, 0,025 g/mL, 0,0125 g/mL, 0,00625 g/mL, 0,00312 g/mL; akrilamid için; 0,4 g/mL, 0,2 g/mL, 0,1 g/mL, 0,05 g/mL, 0,025 g/mL ve 4-MeI için; 0,05 g/mL, 0,025 g/mL, 0,0125 g/mL, 0,00625 g/mL, 0,00312 g/mL konsantrasyonlarında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir bakteritek koloni eldesinden sonra sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Seri seyreltme yöntemine göre hazırlanan tüplere 0,5 McFarland yoğunluktaki bakterilerden 100 µl kimyasal konsantrasyonundan 100 µl eklenmiştir. Vortekste yaklaşık bir dakika karıştırıldıktan sonra 24-48 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriyel gelişimin gözle görüldüğü tüp MİK olarak belirlenmiştir (Özpınar ve ark., 2013 ; Wei ve ark., 2019).



4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Gıdalardaki mikrobiyal bozulmaları sınırlamak için uygulanan dayandırma yöntemlerinin başında ısı işlemler gelmektedir. Ancak, gıdaların belirli şartlarda ısıtılması sırasında akrilamid, furan, imidazol ve kloropropanol türevleri gibi kansere neden olan bileşikler ortaya çıkabilmektedir (Turan ve ark., 2018). Akrilamid ve metabolitleri potansiyel bir karsinojen olarak kabul edilmekte olup insan ve hayvanlarda başka negatif semptomlara da neden olabilmektedirler. Bu nedenle, son yıllarda akrilamidle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Duda-Chodak ve ark., 2015). Akrilamid üzerine yapılan maruziyet çalışmalarında ortalama veriler dikkate alınarak FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi toplantısında ortalama günlük akrilamid alımının 0.2-1 µg akrilamid/kg vücut ağırlığı gün olduğu bildirilmiştir (Boyacı ve Cengiz, 2012).

Gıdalardaki 5-HMF konsantrasyonları, bazı kurutulmuş meyveler ve karamel ürünlerinde büyük ölçüde bazen 1 g/kg'ı aşabilir. Araştırmalarla günlük ortalama alım miktarının 9,7 mg miktarında olabileceğini göstermektedir. Her durumda, tahmini maruz kalma miktarı, akrilamid ve furan gibi diğer ısı kaynaklı gıda toksinleri için tahmini günlük alım miktarından birkaç kat daha fazla olacağı tahmin edilmektedir (Capuano ve Fogliano, 2011).

4-MeI, hem Sınıf III Amonyak Karamelinin hem de Sınıf IV'ün üretiminde kullanılan amonyak işlemi sırasında oluşan kimyasal bir reaksiyon olan amonyak azaltıcı şekerlerin etkileşimi ile oluşur. Avrupa Komisyonu Direktifi uyarınca bu karamel renklerinde maksimum 4-MeI seviyesi < 250 mg/kg ile sınırlı olduğu bildirilmiştir. 4-MeI için ADI (Allowed Daily Intake-İzin Verilen Günlük Alım) değeri 300 mg/kg olarak belirlenmiştir (EFSA, 2011).

Bu çalışmada gıdalara uygulanan ısı işlemler sırasında oluşan akrilamid, 5-HMF ve 4-(5)-MeI'nin bazı bakteriler üzerine inhibisyon etkisi disk difüzyon ve minimum inhibe edici konsantrasyon yöntemleri ile araştırılmıştır.

4.1. Disk Difüzyon Yöntemi İle Bakteriler Üzerine İnhibisyon Etkinin İncelenmesi

5-HMF, akrilamid ve 4-(5)-MeI'ün bazı bakterilere karşı inhibisyon etkisinin incelendiği disk difüzyon yönteminde deneyler üç paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama zon olarak mm cinsinden çizelge 4.1'de verilmiştir. Karşılaştırma grubu olarak kloramfenikol, ampisilin ve streptomisin antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Karşılaştırma grubu sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Çizelge 4.1. 5-HMF ve 4-(5)-MI'ün bakteriler üzerindeki inhibisyonzonları

Bakteriler	KONSANTRASYON									
	5-HMF (0,05 g/mL)	5-HMF (0,025 g/mL)	5-HMF (0,0125 g/mL)	5-HMF (0,00625 g/mL)	5-HMF (0,00312 g/mL)	4-Mel (0,05 g/mL)	4-Mel (0,025 g/mL)	4-Mel (0,0125 g/mL)	4-Mel (0,00625 g/mL)	4-Mel (0,00312 g/mL)
<i>Lactobacillus casei</i>	6 mm	3 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella sp.</i>	15 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea sp.</i>	-	-	-	-	-	18 mm	14 mm	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 mm	5 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	16 mm	12 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	19 mm	14 mm	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	-	-	-	-	-	18 mm	-	-	-	-

-: İnhibisyon yok

Akrilamid, çalışılan hiçbir konsantrasyonda test edilen hiçbir bir bakteride inhibisyona neden olmamıştır.

Çizelge 4.2. Kullanılan antibiyotik disklerin inhibisyonzonları

Bakteriler	Amfisilin A.M.	Streptomisin S-10	Kloramfenikol C-10
<i>Lactobacillus casei</i>	24 mm	-	25 mm
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19 mm	-	20 mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	23 mm	-	27 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	25 mm	-	26 mm
<i>Klebsiella sp.</i>	-	20 mm	26 mm
<i>Yersinia sp.</i>	24 mm	22 mm	28 mm
<i>Pantoea sp.</i>	-	14 mm	19 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	22 mm	22 mm
<i>Escherichiacoli</i>	-	20 mm	21 mm
<i>Entereococcus faecalis</i>	-	19 mm	17 mm
<i>Proteus sp.</i>	-	22 mm	32 mm

-: İnhibisyon yok

Bu çalışmada ele alınan akrilamid, 5-HMF ve 4-MeI'ün inhibisyon etkileri üzerinde literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için, elde edilen sonuçları kıyaslamak için bakterilere karşı antimikrobiyel etkinin araştırıldığı diğer yayınlar kullanılmıştır.

Lactobacillus casei bakterisi ile yapılan deneylerde Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi 0,05 g/mL 5-HMF konsantrasyonu ile 6 mm zon oluşurken 0,025 g/mL konsantrasyonda 3 mm zon oluşmuştur. Uygulanan diğer 5-HMF konsantrasyonlarında zon oluşmamıştır. Akrilamid ve 4-MeI uygulanan konsantrasyonlarında inhibisyona neden olmamıştır. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi bakterinin streptomisine dirençli olduğu gözlenirken ampisilin ve kloramfenikol sırasıyla 24 mm ve 25 mm zon oluşmasına neden olmuştur. 5-HMF ile elde edilen zonlar amfisilin ve kloramfenikol ile elde edilen zonlar ile kıyaslandığında 5-HMF'nin *L.casei* üzerine inhibisyon etkisi düşük olarak bulunmuştur. Streptomisinin herhangi bir zon oluşmasına neden olmaması nedeniyle 5-HMF'nin *L.casei* üzerine streptomisine kıyasla inhibisyon etkisinin yüksek olduğu bulunmuştur.

Değirmencioğlu'nun yaban mersini ekstraktlarının *L.casei*'ye göstermiş olduğu inhibisyon etkiyi araştırdığı çalışmasında Kapıdağ yaprak ekstraktı 20 mm, Erdek taze yaprak ekstraktı da 18 mm zon oluşturmuştur. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında 5-HMF'nin *L.casei*'ye gösterdiği inhibisyonun daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür (Değirmencioğlu ve Değirmencioğlu, 2019).

Lactobacillus plantarum çalışılan kimyasallar herhangi bir inhibisyon etki göstermemiştir. Ampisilin 25 mm, kloramfenikol 26 mm zon oluşturmuştur. Streptomisine direnç göstermiştir. Akhlaghi ve ark. (2019)'nın kahve ekstraktı, % 0.2 sodyum florür ve % 0.2 klorheksidin (CHX) ağız çalkalamalarının inhibisyon etkisini araştırdıkları çalışmasında kahve ekstraktı, sodyum florür ve klorheksidin için % 6,25, 12,5, 25, 50, 100'lük konsantrasyonlar kullanılmıştır. *Lactobacillus plantarum*'a kahve ekstraktları ve florür inhibisyona neden olmamıştır. CHX % 6,25'lik konsantrasyonda 4,98 mm, % 12,5'luk konsantrasyonda 5,94 mm, %25'lik

konsantrasyonda 7,94 mm % 50'lik konsantrasyonda 8,94 mm, % 100'lük konsantrasyonda 11,94 mm zon oluşumuna neden olmuştur.

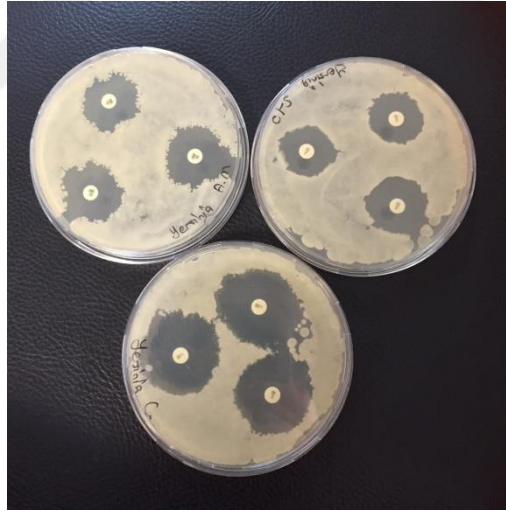
Çalışmamızda kullandığımız kimyasalların hiçbiri *Lactobacillus rhamnosus* bakterisi üzerine inhibisyon etki göstermemiştir. *L. rhamnosus* streptomisine direnç gösterirken ampisilin 19 mm ve kloramfenikol 20 mm zon oluşmasına neden olmuştur. Vatňák ve ark.(2014) *Equisetum arvense* ve *Urtica dioica* bitki ekstraktlarının *L.rhamnosus* CCM 1828 bakterisi üzerine inhibisyon etkisini disk difüzyon metodunu kullanarak araştırdıkları çalışmasında *Equisetum arvense* bitki ekstraktı *L. rhamnosus* gelişimi üzerine inhibisyona neden olmamıştır. *Urtica dioica* bitki ekstraktının neden olduğu zon 2,3 mm olarak belirlenmiştir.

Streptococcus thermophilus bakterisi üzerine uygulanan kimyasalların hiçbiri inhibisyon etki göstermemiştir. Ampisiilin 24 mm, kloramfenikol 27 mm çaplı zonlar oluşmasına neden olurken bakteri streptomisine karşı direnç göstermiştir. Erdoğan (2002), dört bitki türünün (tüm *Artemisia absinthium* ve *Urtica dioica* bitkisinin, *Fumaria officinalis* çiçekli bitkilerinin ve *Rosmarinus officinalis* yapraklarının kurutulmuş özütleri) etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini *invitro* olarak agar difüzyon yöntemiyle test etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda *Fumaria officinalis* ve *Urtica dioica* ile *Artemisia absinthium*'un methanol ve etanol ekstraktları bakteriler üzerine herhangi bir inhibisyon etki göstermemiştir. Bu yönüyle kullandığımız kimyasallarla benzer etki göstermişlerdir. *Artemisia absinthium*'un sırasıyla etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktları *Streptococcus thermophilus* üzerine 15, 13, 12 ve 11 mm zon ile antimikrobiyel etki göstermiştir. *Artemisia absinthium*'un kullandığımız kimyasallara kıyasla daha yüksek antimikrobiyel etkiye sahip olduğu söylenebilir.

5-HMF 0,05 g/mL konsantrasyonda *Klebsiella* sp. bakterisinin geliştiği petride 15 mm çaplı zon oluşmasına neden olmuştur. 5-HMF'nin çalışılan diğer konsantrasyonları akrilamid ve 4-MeI herhangi bir zon oluşumuna neden

olmamıştır. Bakteri ampisiline direnç göstermiştir. Streptomisin ile kloramfenikol sırasıyla, 20 mm ve 26 mm zon oluşmasına neden olmuştur. Nakamura ve ark. (1999) *Ocimum gratissimum*'un uçucu yağının inhibisyon etkisini araştırdığı çalışmasında *Klebsiella* sp. bakterisinde 16 mm zon oluşmuştur. Demo ve ark. (2005) tıbbi bitkilerinden elde edilen uçucu yağların inhibisyon etkisini *Klebsiella* sp. bakterisinde *Ch. ambrosoides* yağında 9 mm olarak belirlemiştir. Bu inhibisyon değeri çalışmamızda 4-MeI uygulamasıyla elde edilen inhibisyon değerinden daha düşük bir değerdir.

Yersinia sp. bakterisi bu çalışmada ele alınan üç kimyasala uygulanan tüm konsantrasyonlara direnç gösterirken, kullanılan antibiyotikli disklerin tamamında gelişimi inhibe olmuştur. Amfisilin, kloramfenikol ve streptomisin antibiyotikli disklerinde oluşan zonlar sırasıyla 24 mm, 22 mm ve 28 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Yersinia* sp. bakterisinde amfisilin, kloramfenikol, streptomisinin neden olduğu zonlar

Yersinia sp. bakterisinde Erdoğrul (2002) *Rosmarinus officinalis*'in sırasıyla etil asetat, metanol ve kloroform ekstraktlarının *Yersinia enterocolitica* O: 3 P41797

üzerine 12, 7 ve 8 mm çaplarında zon ile inhibisyon etki gösterdiği fakat aseton ekstraktının inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 5-HMF, akrilamid ve kloramfenikolün uygulanan konsantrasyonlar dahilinde *Yersinia* sp. üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir.

Pantoea sp. 5-HMF ve akrilamide direnç göstermiştir. 4-MeI 0,05 g/mL konsantrasyonunda 18 mm, 0,025 g/mL konsantrasyonunda 14 mm zon oluşmasına neden olmuştur. Bakteri kullanılan antibiyotikli disklerden ampisiline direnç göstermiştir. Streptomisin diskinde 14 mm kloramfenikolde ise 19 mm zon ölçülmüştür.

Staphylococcus aureus bakterisinde 5-HMF 0,05 g/mL konsantrasyonunda 11 mm ve 0,025 g/mL konsantrasyonunda 5 mm zon oluşmasına neden olmuştur. Diğer 5-HMF konsantrasyonları, akrilamid ve 4-MeI zon oluşmasına neden olmamıştır. *Staphylococcus aureus* amfisiline direnç gösterirken streptomisin ve kloramfenikol 22 mm çaplı zonlar oluşturmuştur. Değirmencioğlu ve Değirmencioğlu'nun (2019) yaban mersini ekstraktlarının *S. aureus* bakterisine karşı Erdek taze meyve ekstraktının ve Kapıdağ kurutulmuş meyve ekstraktının inhibisyon etkisini araştırdığı çalışmada elde ettiği inhibisyon değerleri sırasıyla 22 mm ve 25 mm'dir. Bu inhibisyon çapları elde ettiğimiz inhibisyon değerlerinden yüksektir.

Erdoğan'ın (2002) yaptığı çalışmaya göre *Artemisia absinthium* unetil asetat ile elde edilen ekstraktında elde ettiği 14 mm ve *Rosmarinus officinalis*'in sırasıyla etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 üzerine 15, 11, 10 ve 8 mm zon oluşumunu bildirmişlerdir. Nakamura ve ark. (1999) *Ocimum gratissimum*'un uçucu yağının *Staphylococcus aureus* üzerine elde ettiği inhibisyon değeri olan 17 mm çalışmamızda elde edilen değerden daha yüksek bulunmuştur. Demo ve ark. (2005) tıbbi bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında *S. aureus* bakterisi için oluşan ortalama zon 9 mm olarak bulunmuştur ve maksimum zon *Aloysia triphylla* yağında 36 mm olarak ölçülmüştür. Bu bitkinin ortalama

inhibisyon değeri çalışmamızda elde ettiğimiz ortalama inhibisyon değerinden daha düşük, *Aloysia triphylla* yağında görülen değer daha yüksek bulunmuştur.

Enterococcus faecalis gelişimi üzerine 5-HMF ve akrilamidin çalışılan konsantrasyonları inhibisyona neden olmamıştır. 4-MeI 0,05 g/mL konsantrasyonunda 19 mm zon oluştururken 0,025 g/mL konsantrasyonu 14 mm zon oluşmasına neden olmuştur. *Enterococcus faecalis* antibiyotikli disklerden amfisiline direnç göstermiştir. Streptomisin 19 mm ve kloramfenikol 17 mm çaplı zonlar oluşmasına neden olmuştur. Demo ve ark. (2005) tıbbi bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyel etkisini belirlediği çalışmasında *Aloysia triphylla* yağında 11 mm zon gözlemlemiştir. Bu inhibisyon değeri 4-MeI'ün gösterdiği inhibisyon değerinden daha yüksek bulunmuştur.

Proteus sp. bakterisi 5-HMF ve akrilamide direnç göstermiş, buna karşın 4-MeI 0,05g/mL konsantrasyonda 18 mm zon oluşturmuştur. Bu bakteri ampisilinedirenç gösterirken, kloramfenikol 32 mm ve streptomisin 22 mm zon oluşturmuştur. Shama ve ark. (2018) *Proteus* sp.'ye farklı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan *Psidium guajava*, *Ficus religiosa*, *Cardioermum halicacabum* bitkilerinin inhibisyon etkisini disk difüzyon ve MİK yöntemi ile incelemişlerdir. *Proteus* sp. bakterisine *Psidium guajava* bitkisininin 10,7,5 5 ve 2,5 mg/mL'lik konsantrasyonunun neden olduğu inhibisyon çapı sırasıyla 16, 13, 12, - mm, *Ficus religiosa* bitkisinin neden olduğu zon 13, 11, 6, 8 mm ve *Cardioermum halicacabum* bitkisinin neden olduğu zon 8, 5, 6, 4 mm olmuştur. Demo ve ark. (2005)'nın tıbbi bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel ve antifungal aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada *Proteus mirabilis* bakterisi için ölçülen ortalama zon 6,3 mm olmuştur. Maksimum zon *P. artoides* yağında 14 mm olarak bulunmuştur.

5-HMF, *Escherichia coli* bakterisi üzerine 0,05 g/mL konsantrasyonda ortalama 16 mm ve 0,025 g/mL konsantrasyonda ise 12 mm zon oluşturmuştur (Şekil 4.2). Akrilamid ve 4-MeI zon oluşumuna neden olmamıştır. *E.coli*,

antibiyotikli disklerden ampisiline direnç göstermiş, buna karşın streptomisin ve kloramfenikol sırasıyla 20 mm ve 21 mm zon oluşturmuşlardır.



Şekil 4.2. *Escherichia coli*' de 0,025 g/mL 5-HMF konsantrasyonunda gözlemlenen inhibisyonzonu

Değirmencioğlu ve Değirmencioğlu (2019) Erdek Kapıdağ yaprak ekstraktının *E.coli* üzerindeki inhibisyon etkisini incelediği çalışmasında 22 mm zon oluştuğunu gözlemlemiştir. Kapıdağ kurutulmuş yaprak ekstraktı 25 mm zon oluşumuna neden olmuştur. Bu araştırmacıların elde ettikleri inhibisyon değerleri çalışmamızda elde edilen inhibisyon değerinden yüksek bulunmuştur.

Nakamura ve ark. (1999) *Ocimum gratissimum*'un uçucu yağının antimikrobiyel etkisini araştırmıştır. 24 mg/100 ml DMSO konsantrasyonunda *E.coli*'de 16 mm, 48 mg/100 ml DMSO konsantrasyonunda ise 17 mm çaplı inhibisyon saptamışlardır. Bu zon çapları çalışmamızda elde edilen 5-HMF'nin oluşturduğu zon çaplarına yakın değerdedir.

Erdoğan'ın (2002) yaptığı çalışmada *Artemisia absinthium*, *Fumaria officinalis*, *Urtica dioica*, *Rosmarinus officinalis* numuneleri, bir Soxhlet aparatı

kullanılarak 24 saat boyunca 150 mL etil asetat, metanol, kloroform veya aseton ile özümленerek elde edilen tüm ekstraktlar, 20 mL miktarında boş sterilize edilmiş antibiyotik uygulanmıştır. *Artemisia absinthium* *E.coli*DM'ye 8 mm zon oluşmasına neden olmuştur. *Rosmarinus officinalis*'in sırasıyla etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının *Escherichia coli* DM 16, 10, 14, 15 mm zon oluşturmuştur. *Psidium guajava* bitkisinde etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının 12, 11, 8 ve 5 mm, *Ficus religiosa* bitkisinde 14, 11, 10, 6 mm, *Cardioermum halicacabum* bitkisinde 12, 10, 9, 7 mm zon gözlenmiştir.

Demo ve ark. (2005) tıbbi bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel etkisini araştırdığı çalışmalarında *P. artoides* yağı *E.coli* geliştirilen petride 10,5 mm çaplı zon oluşumuna neden olmuştur. Bu inhibisyon değeri çalışmamızda elde edilenden daha düşük bir inhibisyon değeridir.

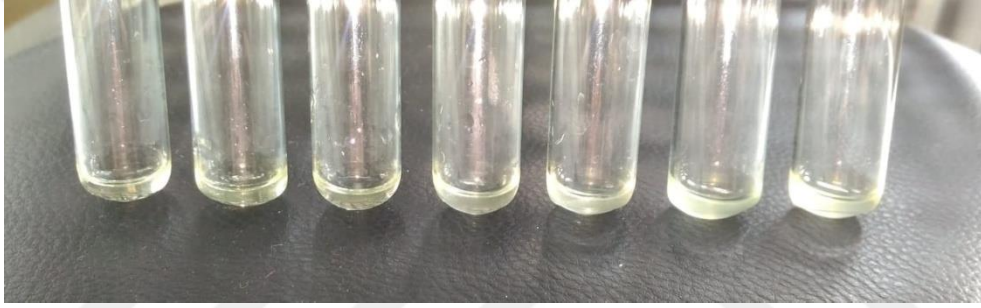
4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Yöntemi İle İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi

Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyel madde konsantrasyonu “Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK)” olarak tanımlanmıştır. Bu amaçla 5-HMF, akrilamid ve 4-MeI'ün farklı konsantrasyonları kullanılmış elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Bakterilerde ölçülen MİK değerleri

BAKTERİ	MİK (g/mL)		
	5-HMF	Akrilamid	4-MeI
<i>Lactobacillus casei</i>	0,025 g/mL	0,4 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,05 g/mL	0,2 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,05 g/mL	0,4 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,025 g/mL	0,1 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Klebsiella</i> sp.	0,025 g/mL	0,5 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Yersinia</i> sp.	0,0125 g/mL	0,2 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Pantoea</i> sp.	0,0125 g/mL	0,1 g/mL	0,0125 g/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0125 g/mL	0,5 g/mL	0,00625 g/mL
<i>Escherichia coli</i>	0,025 g/mL	0,1 g/mL	0,00625 g/mL
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,025 g/mL	0,4 g/mL	0,00625 g/mL
<i>Proteus</i> sp.	0,025 g/mL	0,025 g/mL	0,00625 g/mL

Çalışmamızda *L.rhamnosus* bakterisi için elde edilen MİK değerleri 0,05 g/Mel 5-HMF, 0,2 g/mL akrilamid ve 0,0125 g/mL 4-MeI'dür (Şekil 4.3). Vatfak ve ark. (2014) *Equisetum arvense* ve *Urtica dioica* bitki ekstraktlarının *L.rhamnosus* CCM 1828 antimikrobiyel etkisini MİK analizini uyguladığı çalışmada *Equisetum arvense* bitki ekstraktının MİK değeri >1024 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Urtica dioica* bitki ekstraktının MİK değeri >1024 µg/mL olarak belirlenmiştir. Minimum inhibe eden konsantrasyon değeri çalışmamıza kıyasla daha düşük konsantrasyondadır.



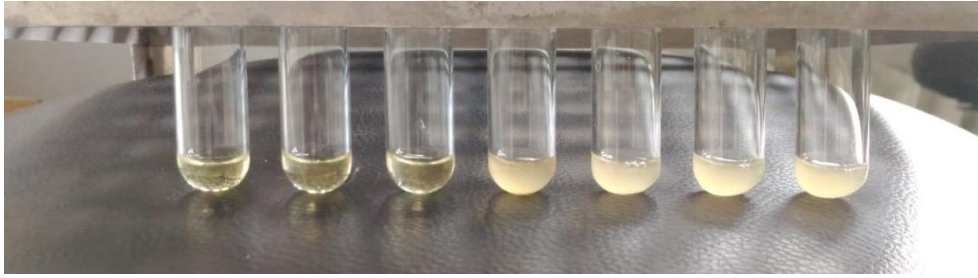
Şekil 4.3. 4-MeI'ün *Lactobacillus rhamnosus* bakterisine inhibisyon etkisi

Lactobacillus casei üzerine MİK değerleri çizelge 4.3'te gösterildiği gibi 5-HMF için 0,025 g/mL, akrilamid için 0,4 g/mL ve 4-MeI için 0,0125 g/mL konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

Streptococcus thermophilus üzerine elde edilen MİK değerleri şöyledir; 0,05 g 5-HMF /mL, 0,4 g akrilamid /mL ve 0,0125 g 4-MeI /mL şeklinde olmuştur.

Gökdoğan-Tekin (2016), farklı organik asitlerin *Streptococcus thermophilus* üzerine inhibisyon etkisini araştırdığı çalışmada propiyonik asit için 0,05 g/mL, formik asit için 0,0125 g/mL ve asetik asit için 0,00652 g/mL MİK değerleri elde etmiştir. Bakteri üremesinin inhibe olduğunu gösteren bu konsantrasyonlar, çalışmamızda kullanılan konsantrasyon değerlerine kıyasla düşük olduğundan inhibisyon etkisinin daha yüksek olduğu sonucu çıkarılabilir (Gökdoğan-Tekin, 2016).

Lactobacillus plantarum ile elde edilen MİK değerleri; 0,05 g 5-HMF /mL, 0,1g akrilamid/mL (Şekil 4.4), 0,0125 g 4-MeI /mL şeklinde bulunmuştur. Çizelge 4.3' te akrilamidin *Lactobacillus plantarum*'a karşı MİK sonuçları gösterilmiştir. Gökdoğan-Tekin (2016)'in propiyonik, asetik ve formik asitin *L. plantarum*' a antibakteriyel etkisini araştırdığı çalışmada propiyonik asit 0,025 g/mL, asetik asit 0,00652 g/mL, formik asit 0,00652 g/mL MİK değerleri bildirmiştir. Akhlaghi ve ark. (2019)'nın kahve ekstraktı, % 0.2 sodyum florür ve % 0.2 klorheksidin (CHX) ağız çalkalama çözeltilerinininhibisyon etkisini araştırdığı çalışmasında *Lactobacillus plantarum*'a kahve ekstraktının neden olduğu MİK değeri 500 mg/mL, CHX'in 0,624 mg/mL, sodyum florürün MİK değeri 2 mg/mL'dir.



Şekil 4.4. Akrilamidin *Lactobacillus plantarum* bakterisine inhibisyon etkisi

Akrilamid, 5-HMF ve 4-MeI için bazı bakterilere karşı elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Klebsiella sp. ile yapılan çalışmada elde edilen MİK değerleri 0,025 g 5-HMF/mL, 0,05 g akrilamid/mL, 0,0125 g 4-MeI/mL'dir. Gökdoğan-Tekin (2016)'in propiyonik asit, asetik asit ve formik asit ile yaptığı çalışmada *Klebsiella pneumoniae* için elde ettiği MİK değeri 0,00652 g/mL'dir. Özpınar ve ark. (2013) çalışmalarında şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının MİK değerini *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883'de 0,1 mg/mL olarak belirlemiştir. Görüldüğü gibi MİK değerleri çalışılan antibakteriyel maddeye bağlı olarak büyük değişiklik göstermektedir.

Yersinia sp.bakterisine karşı deneylerde elde edilen MİK değerleri; 0,0125 g 5-HMF/mL, 0,2 g akrilamid/mL, 0,0125 g 4-MeI/mL şeklinde bulunmuştur. Gökdoğan-Tekin (2016), propiyonik asit, asetik asit ve formik asit ile *Yersinia* sp.'ye karşı elde ettiği MİK değeri 0,00625 g/mL'dir. Bu konsantrasyon değeri çalışmamızda kullanılan kimyasal konsantrasyonlarından düşük bulunmuştur. Özpınar ve ark. (2013) çalışmalarında şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 için MİK değeri 0,01 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Pantoea sp.ile yapılan denemelerde elde edilen MİK değerleri; 0,0125 g 5-HMF/mL, 0,1g akrilamid /mL, 0,0125 g 4-MeI /mL iken, *Staphylococcus aureus*'a karşı elde edilen MİK değerleri;0,0125 g/mL 5-HMF, 0,05g/mL akrilamid, 0,00625 g/mL 4-MeI bulunmuştur. Gökdoğan-Tekin (2016) yaptığı çalışmada *Staphylococcus aureus* bakterisinde elde ettiği MİK değerleri propiyonik asit için 0.00078g/mL, asetik asit 0,00652 g/mL, formik asit 0,00078 g/mL'dir. Bu inhibisyon değerleri bu çalışmada elde edilen MİK değerlerinden daha düşüktür ve dolayısıyla inhibisyon etkisi daha yüksektir. *Ocimum gratissimum*'un uçucu yağının *Staphylococcus aureus* üzerine MİK değeri 0.75 µg/mL bulunmuştur (Nakamura ve ark., 1999).

Enterococcus faecalis MİK değerleri;0,025 g/mL 5-HMF, 0,4 g/mL akrilamid, 0,00625 g/mL 4-MeI konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Özpınar ve ark. (2013) çalışmalarında *Enterococcus faecalis*'e karşı şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının MİK değerini 1mg/mL tespit etmiştir. Gökdoğan-Tekin (2016),üç farklı organik asitin (propiyonik, asetik ve formik asit) *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyel etkilerini incelediği çalışmasında propiyonik asit ve asetik asit için 0,00652 g/mL, formik asit için 0,00078 g/mL MİK değeri tespit etmiştir. Bu çalışmada *E. faecalis*'e karşı elde edilen MİK değerleri çalışmamızda elde edilen konsantrasyon değerinden daha düşüktür

Proteus sp. MİK değerleri;0,025 g/mL 5-HMF, 0,025 g/mL akrilamid, 0,00625 g/mL 4-MeI konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada

şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının *Proteus mirabilis* ATCC 7002 ve *Proteus vulgaris* ATCC 29905 bakterilerine karşı MİK değeri 0,001g/mL olarak bulunmuştur (Özpınar ve ark., 2013). Bu değer çalışmamızda elde edilen değerden yüksektir.

Escherichia coli denemelerinde elde edilen MİK değerleri; 0,025 g 5-HMF /mL, 0,1 g akrilamid/mL, 0,00625 g 4-MeI /mL'dir. Propiyonik ve asetik asitin *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon etkisinin araştırıldığı çalışmada, elde edilen MİK değerleri sırasıyla 0,00652 g/mL ve 0,00078 g/mL olarak bildirilmiştir (Gökdoğan-Tekin, 2016). Özpınar ve ark. (2013) çalışmalarında şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının antibakteriyel etkisini araştırdıkları çalışmada *E.coli*'nin MİK değerini 0,01 g/mL tespit etmişlerdir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

5-HMF, akrilamid ve 4-metilimidazolün *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* sp., *Yersinia* sp. üzerine inhibisyon etkisinin belirtilen maddeler ve uygulanan konsantrasyonlar dahilinde disk difüzyon deneyleri sonuçlarına göre; kimyasallar *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. plantarum*, *Yersinia* sp. bakterilerine karşı inhibe edici etki göstermemiştir.

Akrilamidin disk difüzyon yöntemine göre bakterilere karşı inhibe edici etki göstermediği gözlenmiştir. 5-HMF ve 4-metilimidazol için inhibisyon konsantrasyon arttıkça artış göstermiştir. Amfisilin, streptomisin ve kloramfenikolün göstermiş olduğu inhibe edici etki kimyasalların göstermiş olduğu inhibisyon değerlerinden yüksek bulunmuştur.

5-HMF *Lactobacillus casei*'ye karşı 0,05 g/mL konsantrasyonunda 6 mm, 0,025 g/mL konsantrasyonunda 3 mm; *Staphylococcus aureus*'a karşı 0,05 ve 0,025 g/mL konsantrasyonunda sırasıyla 11 mm ve 5 mm; *Escherichia coli*'ye karşı 0,05 ve 0,025 g/mL konsantrasyonlarında sırasıyla 16 mm ve 12 mm; *Klebsiella* sp.'ye 0,05 g/mL konsantrasyonunda 15 mm çaplarında zonlar oluşturarak inhibe edici etkisi gözlenmiştir. 4-MeI, *Pantoea* sp. 'ye karşı 0,05 g/mL konsantrasyonunda 18 mm, 0,025 g/mL konsantrasyonunda 14 mm; *Enterococcus faecalis*'e karşı 0,05 ve 0,025 g/mL konsantrasyonlarında sırasıyla 19 mm ve 14 mm, *Proteus* sp. 'ye karşı 0,05 g/mL konsantrasyonunda 18 mm çaplarında zonlar ölçülmüştür.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu yönteminde elde edilen sonuca göre; tüm bakteriler üzerine inhibisyon konsantrasyonu belirlenebilmiştir.

Bu sonuçlar ısıtıl işlem kontaminantları olarak bilinen 5-HMF, akrilamid ve 4-metilimidazolün belirli konsantrasyonlarda inhibitör etki gösterebileceğini göstermektedir. Bu kontaminantların diyetle sıklıkla tüketilen gıdalarda (ekmek,

patates kızartması ve cipsi, bal, bisküvi, cola) yüksek miktarda bulunabileceğini gösteren yayınlar doğrultusunda tüketim dozuna dikkat edilmesi gerektiği önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abraham, K., Gurtler, R., Berg, K., Heinemeyer, G., Lampen, A., Appel, E.K. 2011. Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. Mol. Nutr. Food Res, 55:667–678 .
- Akhlaghi, N., Sadeghi, M., Fazeli, F., Akhlaghi, S., Mehnati, M., Sadeghi, M. 2019. The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against Streptococcus mutans and Lactobacillus plantarum: An in vitro study. Dental Research Journal, 16 (5):346-353.
- Akıllıoğlu, G., Mogol, B.A., Gökmen, V., 2011. Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural During Yeast Fermentation. Food Additives and Contaminants, 28(12):1629–1635.
- Aktaş, R.K. (2008). Peksimet Ekmeklerinde HPLC-MS Yöntemi ile Akrilamid Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana bilim Dalı, Ankara, 97s.
- Anese, M., Bot, F., Suman, M., 2014. Furan and 5-hydroxymethylfurfural removal from high- and low-moisture foods. Food Science and Technology 2014(56):529-532.
- Boekel, M.A.J.S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: A Critical Review. Nahrung/Food, 45(3):150-159.
- Burdurlu, H.S., Kardeniz, F. 2002. Gıdalarda Maillard Reaksiyonu. Gıda, 27(2):77-83.
- Capuano, E. ve Fogliano, V., 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF): A Review on Metabolism, Toxicity, Occurrence in Food and Mitigation Strategies. LWT-Food Science and Technology, (44):793-810.
- Cemeroğlu, B.S. 2016. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Bizim Grup Basımevi, 6. Baskı, Ankara, 707s.

- Chan, P.C., Hills, G.D., Kissling, G.E., Nyska, A., 2008. Toxicity and Carcinogenicity Studies of 4-Methylimidazole In F344/N Rats and B6C3F1 Mice. NIH Public Access, 82(1):45–53.
- Charissou, A.L., Aıt-Ameur, L., Birlouez-Aragon, I. 2007. Kinetics of Formation of Three Indicators of the Maillard Reaction in Model Cookies: Influence of Baking Temperature and Type of Sugar. J. Agric. Food Chem., 2007(55):4532–4539.
- Claus, A., Carle, R., Schieber, A. 2008. Acrylamide in Cereal Products: A review. Journal of Cereal Science, 2008 (47):118–133.
- Czerwonka, M., Opilka, J., Tokarz, A., 2018. Evaluation Of 5-Hydroxymethylfurfural Content in Non Alcoholic Drinks. Eur Food Res Technol, 2018(244):11–18.
- Çelik, E.E., Gökmen, V. 2020. Formation of Maillard Reaction Products in Bread Crust-Like Model System Made of Different Whole Cereal Flours. European Food Research and Technology, 2020(246):1207–1218.
- Çelik, R., 2013. 4-Metilimidazol'un İnsan Periferal Lenfositlerinde İn Vitro Genotoksik Etkileri, Çukurova Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, 93s.
- Değirmencioğlu, A., Değirmencioğlu, N. 2019. Taze ve Kurutulmuş Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus*) Meyve ve Yaprak Ekstraktlarının Probiyotik ve Patojen Bakteriler Üzerine Etkileri. Akademik Gıda, Türkiye, 17(3):342-350
- Demo, M., Oliva, M. M., Lopez, M. L., Zunino, M.P., Zygodlo, J.A. 2005. Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina. Pharmaceutical Biology, 43(2):129–134.
- Duda-Chodak, A., Tarko T., Satora P., Sroka P., 2015. Interaction Of Dietary Compounds, Especially Polyphenols, With The Intestinal Microbiota: A Review. Springer, 2015(54):325–341.

- Durling, L.J.K., Busk, L., Hellman, B.E., 2009. Evaluation of the DNA Damaging Effect of the Heat-Induced Food Toxicant 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Various Cell Lines with Different Activities of Sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4):880-884
- Dybing, E., Sanner, T. 2013. Risk Assessment of Acrylamide in Foods. *Toxicological Sciences*, 2003(75), 7–15.
- EFSA. Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Caramel Colours (E 150 a,b,c,d) as Food Additives. 2011. European Food Safety Authority (EFSA), 2011; 9(3):1-103.
- Erdoğan, Ö. T. 2002. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40(4):269–273.
- Erkmen, O. 2010. Gıda Kaynaklı Tehlikeler ve Güvenli Gıda Üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 2010(53):220-235.
- Fennell, T.R., Sumner, S.C.J., Snyder, R.W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W.E., Friedman, M.A., 2005. Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans. *Toxicological Sciences*, 85(1): 447–459.
- Fennell, T.R., Scott L. Watson, S.L., Dhungana, S., Snyder, R.W., 2019. Metabolism of 4-Methylimidazole in Fischer 344 Rats And B6C3F1 Mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2019(123):181-194.
- Florian, S., Bauer-Marinovic, M., Taugner, F., Dobbernack, G., Monien, B.H., Meinel, W., Glatt, H., 2012. Study of 5-hydroxymethylfurfural and its Metabolite 5-sulfooxymethylfurfural on Induction of Colonic aberrant Crypt Foci in Wild-type Mice and Transgenic Mice Expressing Human Sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Wiley*, 2012(56):593–600.
- Giribet, M.C., Ribas, I.A. 2000. Kinetics of Colour Development in Aqueous Glucose Systems at High Temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44:181-189.

- Godfrey V.B., Chen L.-J., Griffin R.J., Lebetkin E.H., Burka L.T., Distribution and Metabolism of 5-Hydroxymethyl-Furfural in Male F344 Rats and B6C3F1 Mice After Oral Administration, 1999. *J. Toxicol. Environ. Health*, Part A: Current Issues, 1999(57):199–210
- Gökdoğan -Tekin, S. 2016. Organik Asitlerin Bakterilerin Biyojen Amin Üretimi ve Gelişimi Üzerindeki Antimikrobiyal Etkilerinin İn-Vitro İncelenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, 116s
- Gölükcü, M., Tokgöz, H., 2005. Gıdalarda Akrilamid Oluşum Mekanizması ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 41-48.
- Hengel M., Shibamoto T., 2013. Carcinogenic 4(5)-Methylimidazole Found in Beverages, Sauces, and Caramel Colors: Chemical Properties, Analysis, and Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.*, 61(4):780–789.
- Ho, W.H., Wang, S.M., Yin, H.S., 2002. Acrylamide Disturbs the Subcellular Distribution of GABA_A Receptor in Brain Neurons. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002(85):561–571.
- Hodge, J.E. 1953. Dehydrated Foods Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Agricultural and Food Chemistry*, 1(15):928-943. <http://www.food-info.net/tr/colour/maillard.htm>
- Işık,Ö., 2008. Pastörizasyon Sıcaklığının Kozan Yerlisi ve Hamlin Portakallarından Üretilen Meyve Sularının Kalitesi Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 131 s.
- Jang, H.W., Jiang, Y., Hengel, M., Shibamoto, T., 2013. Formation of 4(5)-Methylimidazole and Its Precursors, α -Dicarbonyl Compounds, in Maillard Model Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2013(61):6865–6872.

- Jayari, A., Abed, N.E., Jouini, A., Abdul-Wahab, O.M.S., Maarouf, A. 2017. Antibacterial activity of *Thymus capitatus* and *Thymus algeriensis* essential oils against four food-borne pathogens inoculated in minced beef meat. *J Food Saf.*, 2018;38:e12409.
- Karagöz, A., 2009. Akrilamid ve Gıdalarda Bulunuşu. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8(2):187-192.
- Kılıçer, M.C. 2011. Geleneksel Yollarla Üretilen Reçel Örneklerindeki Hidroksimetilfurfural'ın Miktar Tayini, Erciyes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 48s.
- Klejdus, B., Moravcova, J., Lojkova, L., Vacek, J., Kuban, V., 2006. Solid-phase extraction of 4(5)-methylimidazole(4MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-Imidazole (THI) From Foods and Beverages with Subsequent Liquid Chromatographic-Electrospray mass Spectrometric Quantification. *J.Sep.Sci.*, 2006(29):378–384.
- Kocatepe, D., Tırıl, A. 2014. Sağlıklı Beslenme ve Geleneksel Gıdalar. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 3(1):55-63.
- Koç, E. 2015. Gıda Güvenliği ve Kamu Sağlığının Korunması. *Türkiye Adalet Akademisi Dergisi*, 6(22):395 - 426.
- Kowalski, S., Lukasiewicz, M., Duda-Chodak, A., Zięć G., 2013. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural(5-HMF)–Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4): 207-225
- Krishnakumar, T., ve Visvanathan R., 2014. Acrylamide in Food Products: A Review, *Journal of Food Processing & Technology*, 5(7):5-344.
- Li, H., Yang, H., Li, P., Li, M., Yao, Q., Min, L., Zhang, Y., Wang, J., Zheng, N. 2020. Maillard Reaction Products with Furan Ring, Like Furosine, Cause Kidney Injury Through Ferroptosis Pathway. *Food Chemistry*, 2020(319): 126-368.

- Li, Z., Yuan, Y., Yao, Y., Wei, X., Yue, T., Meng, J. 2019. Formation of 5-Hydroxymethylfurfural In Industrial-Scale Apple Juice Concentrate Processing. *Food Control*, 2019(102):56-68.
- Linke, D., 2015. Enzymatic Prevention of Health Risks in Food. *Current Opinion in Food Science*, (1) : 21–27
- Martins, S. I. F. S., Boekel, M. A. J. S. 2005. Kinetics of The Glucose/Glycine Maillard Reaction Pathways: Influences of pH and Reactant Initial Concentrations. *Food Chemistry*, 2005(92):437–448.
- Moon J.K., I Shibamoto T., 2011. Formation of Carcinogenic 4(5)-Methylimidazole in Maillard Reaction Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (59):615–618.
- Motoi, Y., Yoshioka, M., Hirose, H., Ishino, S., Nakajima Y., Miyazaki, S., Miyamoto, S., Sudou, M., Manda, T., ve Murai, M., 1997. Central Nervous Disorder of Calves Consuming Colostrum Containing 4-Methylimidazole or Colostrum from Cows Fed Excess Ammoniated Hay, *JARQ*, 31(3): 225-231.
- Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Bando, E., Negrão Melo, A.F., GarciaCortez, D.A., Dias Filho, B.P. 1999. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *SciELO*, 94(5): 675-678.
- National Toxicology Program. 2007. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Methylimidazole in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies).
- Nguyen, H.T., Fels-Klerx, H.J.V., Peters, R.J.B., Boekel, M.V.A.J.S, 2016. Acrylamide and 5-Hydroxymethylfurfural Formation During Baking Of Biscuits: Part I: Effects Of Sugar Type. *Food Chemistry*, 2016(192):575-585.

- Özer, Ö., Aras, N., Çelik, Karakaş S., Eker, Derici E., Türkmenoğlu, Ö. M., 2014. Kolorektal Kanserin SULT1A1 (Sülfotransferaz) R213H Polimorfizmi ve Sigara Kullanımı ile Risk Değişiminin Araştırılması, Kolon Rektum Hastalıkları Dergisi, 2014(24):35-40.
- Özhan, N.B. 2008. Depolama Süresince Keçiboynuzu Pekmezinde Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları Kinetiği. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 49s.
- Özkök, D., Silici, S., 2016. Effects of honey 5-HMF on enzyme activities and serum biochemical parameters of Wistar rats. Environ Sci Pollut Res, 2016(23):20186–20193.
- Özpınar, H., Dağ, Ş., Yiğit, E. 2013. Şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının antibakteriyel etkisi. Cumhuriyet Tıp Dergisi, Malatya, 2013(35): 172-178.
- Qi, Y., Zhang, H., Wu, G., Zhang, H., Wang, L., Qiana, H., Qi, X., 2018. Reduction of 5-Hydroxymethylfurfural Formation By Flavan-3-Ols In Maillard Reaction Models and Fried Potato Chips. Çin, J Sci Food Agric, 2018(98):5294–5301.
- Qing, X., Ying-hua, L., Xiu-yang, L. 2007. Investigation On Influencing Factors of 5-HMF Content In Schisandra. 8(6):439-445.
- Riboldi, P.B., Vinhas, M.A., Moreira, D.J., 2014. Risks of dietary acrylamide exposure: A systematic review, Food Chemistry, Brezilya, 157(2014): 310-322.
- Rifai, L., Saleh, A.F. 2020. A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. International Journal of Toxicology, 39(2):93-102.
- Saldamlı, İ., Acar, J., Altuğ, T., Kayahan, M., Temiz, A., Us, F., Köksel, H., Sağlam, F., Uygun, Ü., Elmacı, Y., Gökmen, V., Topcu, A., Kocadağlı, T., Hamzaloğlu, B.A., Taş, N. 2014. Gıdalarda Isıl İşlem Sırasında Oluşan

- Zararlı Bileşikler (İ. Saldamlı editör). Gıda Kimyası, 4. Baskı, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 479-514.
- Shama, M., Hridhya, K.V., Kulandhaivel, M. 2018. Evaluation of Antimicrobial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Ethanolic Extract of Three Medicinal Plants Against Bacteria Causing Skin Infection. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 12(1):375-379.
- Shapla UM., Solayman, Md., Alam, N., Khalil. Md., Gan S.H., 2018. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) levels in honey and other foodproducts effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 2018: 12-35
- Smith, S.T., Wolfson, A.J., Jiao, D., Crupain, M.J., Rangan, U., Saptoka, A., Bleich, S.N., Nachman, K.E., 2015. Caramel Color in Soft Drinks and Exposure to 4-Methylimidazole: A Quantitative Risk Assessment, *PLOS ONE*, 10(2):1-13.
- Şimşek C., Özdemir Y., Erdem Z., Arslan T., Velioğlu S.Y., 2015; Karamel Üretiminde 4-(5) Metilimidazol oluşumu ve Toksisitesi. *Akademik Gıda*, 13(2):156-164.
- Tepe, Y., ve Çebi, A., 2019. Acrylamide in Environmental Water: A Review on Sources, Exposure and Public Health Risks. *Expo Health*, 2019(11):3-12.
- Turan, S., Solak, S., Keskin, Ş. 2018. Gıdalarda Monokloropropandiol Esterlerinin Oluşumu ve Belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 16(2):210-217.
- Vatřák, A., Kolesárová, A., Vukovič, N., Rovná, K., Petrová, J., Vimmerová, V., Hleba, L., Mellen, M., Kačániová, M. 2014. Screening Of Plant Extracts For Antimicrobial Activity Against Bacteria. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 2014(3):177-180.
- Vattem, D.A. ve Shetty, K., 2003. Acrylamide İn Food: A Model For Mechanism of Formation and Its Reduction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2003(4):331–338.

- Vleeschouwer K.D., Plancken I.V., Loey A.V., Hendrickx M.E., 2007. Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions as Affected by Water Activity. American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers Published on Web, 2007(23):722–728.
- Wang, Z., Wen, C., Shi, X., Lu, D., Deng, J. 2017. Simultaneous inhibition of acrylamide and hydroxymethylfurfural formation by sodium glutamate microcapsules in an asparagine–glucose model system. J Food Sci Technol, 54(2):572–577.
- Wei, L., Zhao, J., Meng, Y., Guo, Y., Luo, C. 2019. Antibacterial activity, safety and preservative effect of aminoethyl-phloretin on the quality parameters of salmon fillets. Food Science and Technology, 118(2020):108-874.
- Wieczorek, M.N., Przygoński, K., Jelen, H.H. 2018. Determination of 4-Methylimidazole in Ammonia Caramel Using Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). Journal of Food Quality, 2018:1-5.
- Wu, X., Yu, D., Kong, F., Yu, S. 2016. Effects of divalent cations on the formation of 4(5)-methylimidazole in fructose/ammonium hydroxide caramel model reaction. Food Chemistry, 201(2016):253-258.
- Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., Shi, J. 2014. Risk Assessment, Formation, and Mitigation of Dietary Acrylamide: Current Status and Future Prospects. Food and Chemical Toxicology, 69(2014):1-12.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A. 2003. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Polygonum cognatum Meissn Extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83: 64-69.
- Yıldız, O., Şahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö., Kolaylı, S., 2010. Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi. Akademik Gıda, 8(6):44-51.
- Yin, M., Tsao, S., 1999. Inhibitory Effect Of Seven Allium Plants Upon Three Aspergillus. International Journal Of Food Microbiology, 49(1999) :49–56.

- Yu, S., Chen, Z., Meng, H., Chen, M. 2019. Addition of Lipophilic Grape Seed Proanthocyanidin Effectively Reduces Acrylamide Formation. *J Sci Food Agric*, 2020(100):1213–1219.
- Zhang, L.L., Kong, Y., Yang, X., Zhang, Y.Y., Sun, B.G., Chen, H.T., Sun, Y., 2019. Kinetics of 5-hydroxymethylfurfural formation in the sugar–amino acid model of Maillard reaction. *J Sci Food Agric*, 2019(99):2340–2347.
- Zhang, Y., Zhang, Y. 2007. Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on the Current State of Knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5):521-542.
- Zhang, Y., Huang, M., Zhuang, P., Jiao, J., Chen, X., Wang, J., Wu, Y., 2018. Exposure To Acrylamide And The Risk of Cardiovascular Diseases In The National Health And Nutrition Examination Survey 2003–2006. *Environment International*, 117:154-163.
- Zhao, M., Wang, P., Li, D., Shang, J., Hu X. ve Chen, F., 2017. Protection against neo-formed contaminants (NFCs)-induced toxicity by phytochemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 108(Bölüm B):392-406.
- Zyzak, D.V., Sanders, R.A., Stojanovic, M., Tallmadge D.H., Eberhart, B.L., Ewald, D.K., Gruber, D.C., Morsch, T.R., Strothers, M.A., Rizzi, G.P., Villagran, M.D., 2003. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4782–4787.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Adana’da dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2017 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Eğitimine hâlen devam etmektedir. Olgü Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti..’de görev yapmaktadır.

