

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLI PİŞİRME KOŞULLARININ SUCUKTA
HETEROSİKLİK AMİN (HCA) OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİSİ**

Burcu ACAR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 13.01.2016

Bornova-İZMİR

2016

Burcu ACAR tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Farklı pişirme koşullarının sucukta heterosiklik amin (HCA) oluşumu üzerine etkisi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.01.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülen YILDIZ TURP

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem ÇAĞINDI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Farklı pişirme koşullarının sucukta heterosiklik amin (HCA) oluşumu üzerine etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13/01/2016

İmzası

Adı-Soyadı

Burcu ACAR

ÖZET**FARKLI PIŞİRME KOŞULLARININ SUCUKTA HETEROSİKLİK AMİN
(HCA) OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

ACAR, Burcu

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

Ocak 2016, 69 sayfa

İnsan sağlığı açısından yaşamı tehdit eden kanser, sebebi bilinen ölüm sebepleri sıralamasında kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalara göre beslenme ve kanser arasında ciddi bir ilişki bulunmaktadır. Gıdaların uygun şartlarda pişirilmemesi, saklanmaması sonucunda insan sağlığı için zararlı bileşikler oluşabilmektedir. Özellikle et ve et ürünleri gibi proteinlerce zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sonucunda mutajenik veya kanserojenik yapıda bileşikler oluşabildiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu bileşiklerin başında ise heterosiklik aminlerin (HCA) geldiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile piyasada satılan 10 farklı fermente sucuk örneğinin tavada farklı pişirme sonucunda HCA çeşit ve miktarları belirlenmiştir. Tez çalışmasında sucuk örneklerinde HCA çeşit ve miktarları belirlenirken HPLC analizi sonucunda elde edilen piklerden faydalanılarak DAD dedektörde IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx bileşikleri, floresans dedektörde ise PhIP, norharman ve harman bileşikleri tespit edilmiştir. Az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinde HCA ve çözümlü protein analizi yapılmıştır. Ayrıca çiğ sucuk örneklerinde nem, kül, protein, yağ ve pH analizleri yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda az pişmiş sucuk örneklerinde toplam HCA miktarı 0,65 ng/g ile 14,84 ng/g arasında, orta pişmiş sucuk örneklerinde toplam HCA miktarı 1,52 ng/g ile 16,10 ng/g arasında, çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 1,83 ng/g ile 17,89 ng/g arasında belirlenmiştir. Çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği, az pişmiş örneklerin toplam HCA içeriğinden fazla bulunmuştur ($P<0,05$). Örneklerde en fazla bulunan heterosiklik amin norharmandır. Sonuçlar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir. Tava da pişirme yöntemiyle pişirilen sucuk örneklerinin hiçbirinde yüksek miktarlarda HCA tespit edilememiştir.

Anahtar sözcükler: HPLC, heterosiklik amin (HCA), sucuk.

ABSTRACT**EFFECTS OF DIFFERENT COOKING CONDITIONS ON THE FORMATION OF HETEROCYCLIC AMINES IN SUCUK SAMPLES**

ACAR, Burcu

MSc in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

January 2016, 69 pages

Cancer threatens the health of people and it is the second most seen death reason after cardiovascular diseases. According to epidemiological and experimental studies, there is an important relation between nutrition and cancer. Harmful compounds can be formed because of undercooked and stored food. Mutagenic and cancerogenic compounds can be formed after cooking of protein-riched foods such as meat and meat products. Heterocyclic amines (HCAs) are one of the most formed ones. In this thesis, HCA quality and quantity determined in commercially available 10 fermented sucuk samples, which were pan cooked at different cooking results. HCA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the peaks for IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx at DAD detector and for PhIP, norharman ve harman at fluorescence detector. HCA and soluble protein analyses were performed in undercooked, middle cooked and well cooked sucuk samples. Moisture content, ash content, protein content, lipid content and pH analyses were performed in raw sucuk samples. According to the results of HCA analyses, total HCA content of undercooked sucuk samples' was between 0.65 ng/g and 14.84 ng/g, total HCA content of medium cooked sucuk samples' was between 1.52 ng/g and 16.10 ng/g, total HCA content of overcooked sucuk samples' was between 1.83 ng/g ile 17.89 ng/g. Total HCA content of overcooked sucuk samples were higher than the undercooked sucuk samples ($P < 0.05$). Norharman is the most abundant HCA in sucuk samples. Results were evaluated statistically. HCA content of pan fried sucuk samples were not found on high levels.

Key words: heterocyclic amines (HCA), sucuk, HPLC.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam, bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK'a teşekkürü borç bilirim.

Tezim boyunca moral desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan nişanlım Recep Çolakoğlu'na teşekkür ederim.

Yüksek lisansım ve tüm eğitim hayatım boyunca bana sürekli destek olup cesaret veren, maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Sevilay ACAR, babam Aytekin ACAR ve bana her zaman moral olan kardeşlerim Behice ACAR ve Berna ACAR'a teşekkür ederim.

Burcu ACAR

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------|---------------------|
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | ix |
| TEŞEKKÜR | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xvi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | xix |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | 4 |
| 2.1. Sucuk ve Kimyasal Bileşimi | 4 |
| 2.2. Heterosiklik Aminlerin Oluşumu | 5 |
| 2.3. HCA'ların Kimyasal Yapıları..... | 7 |
| 2.3.1. HCA'ların sınıflandırılması..... | 7 |
| 2.3.2. HCA'ların oluşum mekanizmaları..... | 10 |
| 2.4. HCA'ların Oluşumunu Etkileyen Faktörler | 11 |
| 2.4.1. Pişirme sıcaklığı ve süresi | 12 |
| 2.4.2. Kreatin içeriği..... | 12 |

İÇİNDEKİLER (Devam)**Sayfa**

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3. Yağ içeriği | 13 |
| 2.4.4. Antioksidan içeriği | 13 |
| 2.4.5. Aminoasit içeriği..... | 14 |
| 2.4.6. Su içeriği | 14 |
| 2.4.7. Pişirme metodu | 15 |
| 2.4.8. Gıda katkı maddeleri..... | 15 |
| 2.5.Heterosiklik Aminlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi | 15 |
| 2.6. Heterosiklik Aminleri Tespit Metotları..... | 16 |
| 3.MATERYAL VE YÖNTEM | 18 |
| 3.1.Materyal | 18 |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasallar | 18 |
| 3.1.2.Kullanılan cihazlar | 19 |
| 3.2.Metot | 19 |
| 3.2.1. Deneme deseni | 19 |
| 3.2.2.HCA analizi | 20 |
| 4.BULGULAR VE TARTIŞMA | 26 |

İÇİNDEKİLER (Devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 4.1. HPLC’de Heterosiklik Amin (HCA) Analiz Yönteminin Validasyonu..... | 26 |
| 4.2.Sucuk Örneklerinin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi..... | 35 |
| 4.2.1. Çiğ sucuk örneklerinin analiz sonuçlarının değerlendirilmesi | 35 |
| 4.2.2. Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan analiz sonuçların değerlendirilmesi | 40 |
| 4.2.3. Pişmiş sucuk örneklerinin HCA miktarlarının sonuçları..... | 42 |
| 5.SONUÇ..... | 56 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 60 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 69 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.1. İmidazokinokzalinler (IQx) ve imidazokinolinlerin (IQ) oluşumu..... | 5 |
| 2.2. Pişirilmiş gıdalarda bulunduğu tespit edilen heterosiklik aromatik aminlerin yapıları | 7 |
| 2.3. HCA'lerin metabolize olması sonucu kanserin ortaya çıkmasının şematik olarak gösterimi..... | 11 |
| 3.1. Protein analizinde kullanılan Dumas cihazı..... | 24 |
| 4.1. IQ bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği..... | 26 |
| 4.2. MeIQx bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği | 26 |
| 4.3. 4,8-DiMeIQx bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği | 27 |
| 4.4. PhIP bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği | 27 |
| 4.5. Harman bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği | 28 |
| 4.6. Norharman bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği..... | 28 |
| 4.7. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik IQ bileşiği standardının HPLC kromatogramı | 29 |
| 4.8. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik MeIQx bileşiği standardının HPLC kromatogramı..... | 30 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.9. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik 4,8-DiMeIQx bileşiği standardının HPLC kromatogramı | 30 |
| 4.10. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik PhIP bileşiği standardının HPLC kromatogramı .. | 31 |
| 4.11. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik Harman bileşiği standardının HPLC kromatogramı | 31 |
| 4.12. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik Norharman bileşiği standardının HPLC kromatogramları | 32 |
| 4.13. DAD dedektörde az pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı..... | 32 |
| 4.14. DAD dedektörde orta pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı | 33 |
| 4.15. DAD dedektörde çok pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı | 33 |
| 4.16. Floresans dedektörde az pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı | 34 |
| 4.17. Floresans dedektörde orta pişmiş örnek 10'a ait HPLC kromatogramı | 34 |
| 4.18. Floresans dedektörde çok pişmiş örnek 10'a ait HPLC kromatogramı..... | 34 |
| 4.19. Toplam HCA miktarının örneklere göre dağılımı | 52 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Sucuğun kimyasal bileşimi | 4 |
| 2.2. Amino-imidazo azaarenler ve aminokarbolinler grubunda bulunan HCA'lar..... | 9 |
| 3.1. Deneme deseni | 20 |
| 3.2. DAD dedektör dereceli elüsyon programı | 21 |
| 3.3. DAD dedektör dereceli elüsyon programı | 22 |
| 3.4. Ekstraksiyon metodunun performans özellikleri | 25 |
| 4.1. Az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin merkez sıcaklıkları | 35 |
| 4.2. Çiğ sucuklarda yapılan analiz sonuçlarının ortalaması..... | 35 |
| 4.3. Pişmiş sucuklarda yapılan çözümlü protein analiz sonuçlarının ortalaması..... | 41 |
| 4.4. Pişmiş sucuk örneklerinin IQ miktarları (mg/kg) | 42 |
| 4.5. Pişmiş sucuk örneklerinin norharman miktarları (mg/kg) | 45 |
| 4.6. Pişmiş sucuk örneklerinin PhIP miktarları (ng/g)..... | 47 |
| 4.7. Pişmiş sucuk örneklerinin Norharman miktarları (ng/g) | 49 |
| 4.8. Pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları (ng/g)..... | 51 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1,5,6-TMIP | 2-amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]-pyridine |
| 3,5,6-TMIP | 2-amino-3,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]-pyridine |
| 4,8-DiMeIQx | 2-amino-3,4,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline |
| 8-MeIQx | 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline |
| AIA | Aminoimidazoazoaren |
| A α C | 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole |
| Cre-P-1 | 4-amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrolo-[3,4f]benzimidazole-5,7-dione |
| DAD | Diode array dedektör |
| ECD | Elektrokimyasal dedektörler |
| FD | Fluoresans dedektör |
| GC | Gaz kromatografisi |
| Glu-P-1 | 2-amino-6-methyldipyrido-[1,2-a:3',2'-d]imidazole |
| Glu-P-2 | 2-aminodipyrido-[1,2-a:3',2'-d]imidazole |
| GST | Glutathione S-transferazlar |
| Harman | 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole |

KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| HCA | Heterosiklik amin |
| HPLC | Yüksek performans sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) |
| IQ | 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoline |
| Lys-P-1 | 3,4-cyclopenteno-pyrido[3,2-a]carbazole |
| MeAαC | 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole |
| MeIQ | 2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]- quinoline |
| MS | Kütle spektrometresi |
| ng/g | Nanogram/gram |
| Norharman | 9H-pyrido[3,4-b]indole |
| Orn-P-1 | 4-amino-6-methyl-1H-2,5,10,10btetraazafluoranthene |
| Phe-P-1 | 2-amino-5-fenilpiridin (2-amino-5-phenylpyridine) |
| PhIP | 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridin |
| PhIP | 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine |
| SPE | Katı faz ekstraksiyonu |
| SPME | Katı faz mikro ekstraksiyon |

KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| TD ₅₀ | Median toksik doz |
| TriMeIQx | 2-amino-3,4,7,8-tetramethyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline |
| Trp-P-1 | 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]-İndole |
| Trp-P-2 | 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole |
| UGTs | UDP-glucuronsyl transferazlar |

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun yaşamındaki en önemli unsurlardan biri beslenmedir. Gıdalar, esansiyel iz elementler ve vitaminleri sağlayan mikro bileşikler ve enerji sağlayan makro bileşiklerin kompleks bir karışımından oluşmaktadır. Gıdalar mikrobiyal kontaminantlar, toksinler veya istenmeyen çeşitli kimyasal maddeler gibi birçok zararlı bileşikleri içerebilmektedirler. Dolayısıyla, bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde oldukça önemli rol oynayan gıdalar, aynı zamanda birçok hastalığın ortaya çıkmasından da sorumlu olarak bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, kanser hastalıklarının artışıyla beslenmenin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle et ve et ürünleri gibi proteince zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında, mutajenik ve kanserojenik olan bazı bileşiklerin oluştuğunu göstermektedir. Bu bileşiklerin en başında heterosiklik amin (HCA)'lar gelmektedir (Öz ve Kaya, 2006).

Et ve et ürünlerinin birçoğu ızgara, rosto, yağda kızartma gibi çeşitli yöntemlerle pişirildikten sonra tüketilmektedir (Çicek ve Bulgan, 2013). Fermente et ürünü olan sucuk; kıyılmış et ve yağın, tuz, nitrat ve/veya nitrit, şeker, çeşitli baharat ve/veya starter kültürler katılarak karıştırılması ile elde edilen hamurun, doğal veya sentetik kılıflara doldurulduktan sonra fermentasyona ve kurumaya maruz bırakılarak üretilmektedir (Hugas and Monfort, 1997; Soyer, 2002).

Heterosiklik aminler (HCA) özellikle protein bakımından zengin gıdaların (et ve balık gibi) yüksek sıcaklıklarda (>150 °C) pişirilmesi ve saklanması sırasında oluşan, bazı mutajenik ve karsinojenik etkilerinin olduğu bilinen bileşiklerdir (Murkovic, 2007; Güven, 2009).

HCA'lar özellikle tavada kızartma ve mangal gibi evde pişirme yöntemleri kullanılarak pişirilmiş et ürünlerinin yanı sıra fast food ve restoranlarda pişirilmiş etlerde de belirlenmiştir. Günümüzde bu yöntemlerle pişirilmiş gıdalarda 20'den fazla mutajenik veya kanserojenik HCA belirlenerek tanımlanmıştır (Hwang and Ngadi, 2002; Skog, 2002). HCA'lar genelde 200–300°C'de erime özelliğine sahip dayanıklı bileşiklerdir (Grivas, 2000).

Pişmiş et ürünlerinde en çok belirlenen HCA'lar 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin(MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin (4,8-DiMeIQx) ve 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP)'dir (Çicek ve Bulgan, 2013).

Gıdalarda bulunan HCA'lar, halka yapılarında bir veya daha fazla azot içeren çok halkalı aromatik yapıya sahip bileşikler olarak bilinmektedir. Bu bileşikler ekzosiklik amino grubu içermektedir. Bu bileşiklerden bazıları karakteristik UV absorpsiyonuna ve yüksek ekstinksiyon katsayısına, bazıları ise fluoresans özelliğe sahip bileşiklerdir (Kataoka and Kijima, 1997; Skog, 2004).

Heterosiklik aminler kompleks örnek matrislerinde ve düşük düzeylerde (ppb) bulduklarından, bu bileşiklerin belirlenebilmesi için etkin bir saflaştırma işlemine ve duyarlı, seçici bir analitik yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Özdehan et al. (2014) tarafından geliştirilen ekstraksiyon ve saflaştırma yönteminin mevcut diğer yöntemlere kıyasla daha doğru sonuç verdiği belirtilmiştir. Heterosiklik aminlerin belirlenebilmesi için genellikle zıt-faz yüksek performans sıvı kromatografisi farklı tipte dedektörler (DAD, fluoresans dedektör, elektrokimyasal dedektör veya kütle spektrometresi) ile birlikte kullanılabildiği belirtilmiştir (Öz and Kaya, 2011; Keşkekoğlu ve Üren, 2014; Özdehan et al., 2014).

HCA analizlerinde, HCA'ların pişmiş gıdalarda ng/g gibi çok düşük miktarlarda bulunması, gıda matrisinin kompleks olması ve analizde ekstraksiyon, saflaştırma ve konsantrasyon gibi pek çok izolasyon basamağına ihtiyaç duyulması doğru tespiti zorlaştırmaktadır. Bunların yanısıra HCA analiz yöntemleri genel olarak maliyeti yüksek ve uzun süren analizlerdir (Meester, 1998; Sahar et al., 2010).

Heterosiklik aminler yapılarında konjuge çift bağ içerdiklerinden fluoresans özellik gösteren bileşiklerdir. HCA'ların bu özellikleri HPLC analizlerinde tespit edilmelerinde kullanılmaktadır. Heterosiklik aminlerin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri HPLC-fluoresans tespit yöntemleridir. HPLC-fluoresans yöntemi daha yüksek seçicilik ve hassaslık sağlamaktadır (Sahar et al., 2010).

Literatürler incelendiğinde ülkemizde HCA ile ilgili çalışma içeriği ve sayısı çok sınırlıdır. Ülkemizde farklı geleneksel et pişirme yöntemlerinin fazla olması ve yüksek ısı ile işlemin uygulandığı düşünüldüğünde fazla oranda HCA oluşumu beklenmektedir. Bu beklenti göz önüne alındığında toplumun yoğun olarak kullandığı et ürünleri ve pişirme şartlarında oluşan HCA içeriğinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Tüm dünyada araştırmacılar son zamanlarda, heterosiklik aminlerin (HCA) oluşumları, farklı gıda ürünlerinde ortaya çıkmaları, maruz kalma seviyeleri, biyoyararlılıkları, biyokullanılabilirlikleri ve kanserojen olmaları gibi çeşitli yönleri üzerinde çalışmakla meşguldürler ve insanlarda kanser gelişimindeki önemini saptamaya çalışmaktadırlar. Tez çalışmamızın amacı piyasada satılan 10 farklı sucuk örneğinin farklı pişirme koşullarında HCA çeşit ve miktarlarının belirlenmesidir. Tez çalışmasında sucuk örneklerinde HCA çeşit ve miktarları belirlenirken HPLC analizi sonucunda elde edilen piklerden faydalanılmıştır. Bunun için IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx bileşikleri DAD dedektörde, PhIP, norharman ve harman bileşikleri ise floresans dedektörde tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sucuk ve Kimyasal Bileşimi

Büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı %40 ve altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtma işlemi uygulanmamış fermente et ürünüdür (Anon., 2012).

Fermente bir et ürünü olan sucuk; kıyılmış et ve yağın, tuz, nitrat ve/veya nitrit, şeker, çeşitli baharat ve/veya starter kültürler katılarak, karıştırılması ile elde edilen hamurun, doğal veya sentetik kılıflara doldurulması, daha sonra fermentasyona ve kurumaya maruz bırakılması ile üretilmektedir (Hugas and Monfort, 1997; Soyer, 2002). Çizelge 2.1'de sucuğun kimyasal bileşimi verilmektedir (Anon., 2002).

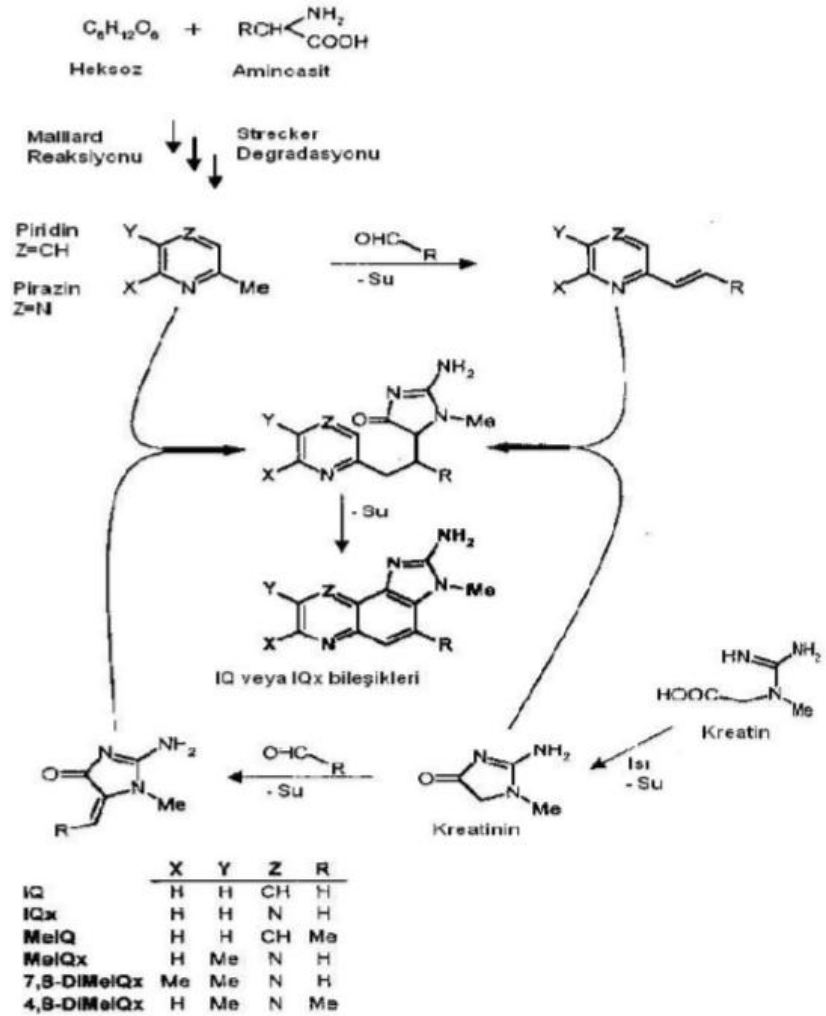
Çizelge 2.1. Sucuğun kimyasal bileşimi (Anon., 2002)

| Bileşenler | Bileşim (%) |
|-------------------|--------------------|
| Nem miktarı | En çok %40 |
| Tuz miktarı | En çok %5 |
| Ph | 4,7-5,4 |
| Yağ miktarı | En çok %35 |
| Protein miktarı | En az %22 |

2.2. Heterosiklik Aminlerin Oluşumu

HCA'lar et ve balık gibi proteince zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta (>150 °C) pişirilmesi esnasında, kreatin, şeker, aminoasitler ve diğer kas dokusu bileşenleri arasındaki reaksiyonlar sonucu ppb düzeyinde oluşan bileşiklerdir (Keşkekoğlu ve Üren, 2014).

HCA'ların bazı öncül maddeleri, kreatin/kreatinin ve aminoasitler gibi bileşikler, şekerler, peptidler ve proteinlerdir (Öz ve Kaya, 2007). İndirgen şekerler ile peptid, aminoasit veya aminlerin birlikte bulunması halinde özellikle yüksek sıcaklıklarda, oluşan Maillard reaksiyonu AIA (Aminoimidazoazoaren)'ların ve aminokarbolinlerin oluşumu için önemli bileşiklerdir (Jägerstad et al., 1998). Şekil 2.1'de heterosiklik aminlerin oluşumu gösterilmektedir.

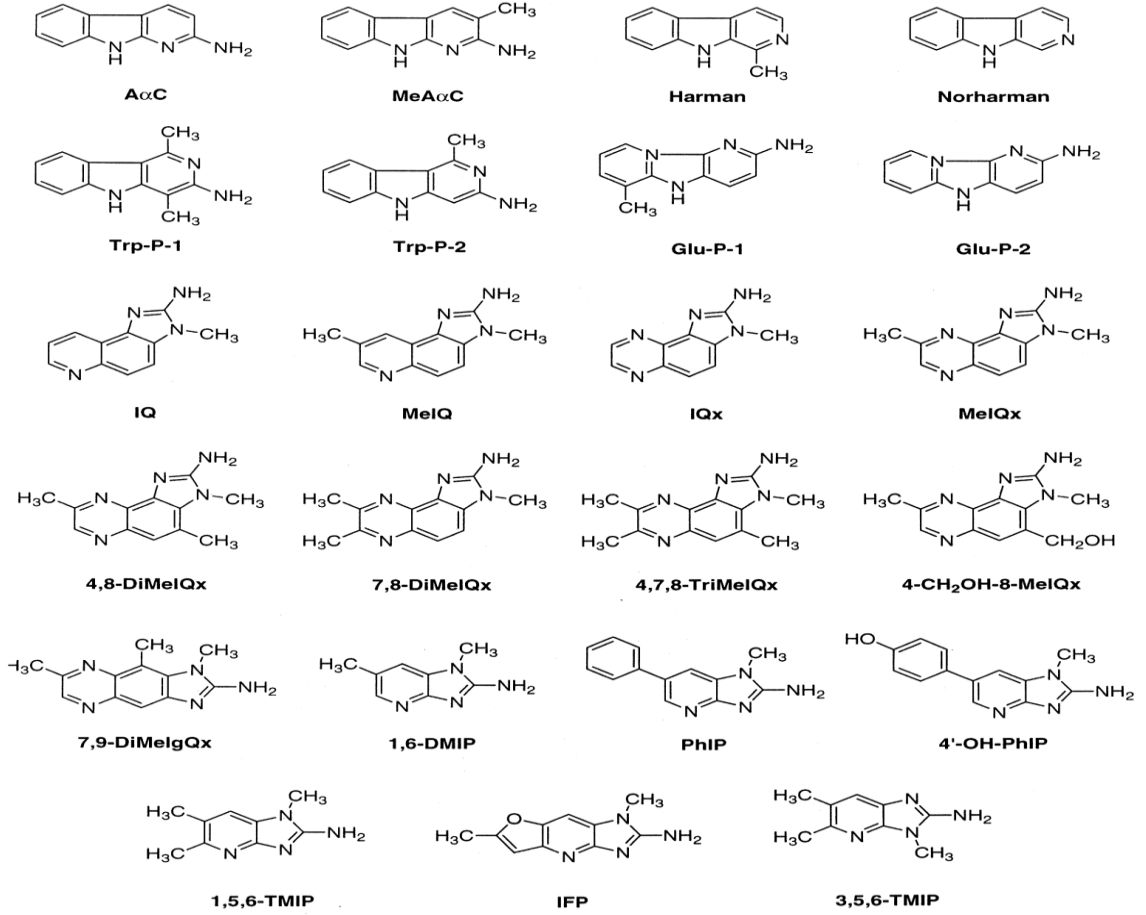


Şekil 2.1. İmidazokinoksalinler (IQx) ve imidazokinolinlerin (IQ) oluşumu (Felton et al., 2000)

Günümüze kadar 20'den fazla HCA tanımlanmıştır ve pişmiş ette ve balıkta en yaygın bulunan bileşikler; PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin) ve MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5- f]kinokzalin)'dir (Kataoka and Kijima 1997; Keating et al., 1999).

Felton et al. (1986)'nın yaptığı bir çalışmada ısıl işlem görmüş gıdalarda en önemli grubu oluşturan AIA'lar, IQ (2- amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin) ve MeIQ (2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- f]kinolin) da olduğu gibi ya bir kinolin veya MeIQx ve 4,8-DiMeIQx (2-amino-3,4,8- trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin)'de olduğu gibi kinokzalin ya da PhIP'de olduğu gibi bir piridin halkası ile birleşmiş imidazo grubuna sahiptir. Ayrıca bu bileşikler imidazo halkasındaki azotların birinin üzerinde, bir metil grubuna ve imidazo halkasına bağlı bir veya daha fazla aromatik halkaya sahiptir.

IQ tipi bileşikler veya termik HCA'lar olarak adlandırılan AIA'lar gıdaların 150–300°C gibi yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında serbest aminoasitler, kreatin veya kreatinin ve heksozlar arasındaki reaksiyonlardan dolayı oluşmaktadır. Bu sınıfa ait bileşiklerin sayısı halen artış göstermektedir. Glu-P-1 (2-amino-6-metil dipirido[1,2-a:3₁,2₁-d]imidazol), Glu-P-2 (2-amino dipirido[1,2-a:3₁,2₁-d]imidazol), Phe-P-1 (2-amino-5-fenilpiridin), Trp-P-1 (3- amino-1,4-dimetil-5Hpirido[4,3-b]indol), Trp-P-2 (3-amino-1-metil-5H- pirido[4,3-b]indol), AαC (2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol) ve MeAαC (2-amino-3- metil-9H pirido[2,3-b]indol) gibi aminokarbolinler ise 300°C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda oluşmaktadır (Toribio et al., 2002; Kızıl ve Besler, 2012). Şekil 2.2.'de pişirilmiş gıdalarda bulunduğu tespit edilen heterosiklik aminlerin yapıları görülmektedir (Pais and Knize, 2000).



Şekil 2.2. Pişirilmiş gıdalarda bulunduğu tespit edilen HCA'ların yapıları (Pais and Knize, 2000)

Maillard reaksiyonu etlerin kızartılması ve rosto yapılması sırasında istenilen yüzey esmerleşmesini sağlaması açısından oldukça önemlidir. Pişmiş ette HCA içeriğinin iki indikatörü etin esmerleşme derecesi ve iç sıcaklığı olarak belirtilmiştir. Bu hipotez model sistemlerde incelenmiştir ve bulunan sonuçlar daha sonra et ile yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır (Canlı, 2012).

2.3. HCA'ların Kimyasal Yapıları

2.3.1. HCA'ların sınıflandırılması

HCA'lar oluşum mekanizmalarına göre iki ana kimyasal sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlardan birincisi aminoimidazoazoenler (AIA) ve ikincisi ise aminokarbolinlerdir (Kızıllı ve Besler, 2012).

2.3.1.1. Aminoimidazoazoarenler

Isıl işlem görmüş gıdalarda en önemli grubu oluşturmaktadırlar, IQ tipi bileşikler veya termik HCA'lar olarak da adlandırılmaktadırlar ve gıdaların, normal ev tipi pişirme sıcaklıklarında (150–300°C) pişirilmesi sırasında serbest aminoasitler, kreatin/kreatinin ve heksozlar arasındaki reaksiyonlarla oluşmaktadırlar. Bu gruba giren başlıca HCA'lar IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, ve PhIP bileşikleridir (Persson et al., 2003; Kızıl ve Besler, 2012).

2.3.1.2. Aminokarbolinler

300°C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda proteinler ve aminoasitlerin pirolizi sonucu oluşmaktadır (Toribio et al., 2002). Bu yüzden pirolitik HCA'lar olarak da bilinmektedir. Bu gruba giren başlıca HCA'lar ise Glu-P-1, Glu-P-2, Phe-P-1, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC ve MeAαC'dir. Başka bir sınıflandırma ise HCA'ların kanserojen özelliklerine göre belirlenmiştir. Bu sınıflandırmada uluslararası kanser araştırmaları ajansı heterosiklik aminlerin bir kısmını kuvvetle muhtemel (possible) kanserojen (2B sınıfı: MeIQ, 8-MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2) ve bir tanesini de muhtemel (probable) kanserojen (2A sınıfı: IQ) olarak sınıflandırmıştır. Bunun yanısıra yapılan birçok epidemiyolojik çalışma, et tüketimi ile kolon kanseri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir ve heterosiklik aminler bu ilişkiden sorumlu bileşik olarak görülmektedir (Sun et al., 2010; Kızıl ve Besler, 2012).

Gıdalarda bulunan heterosiklik aminlerin hepsi bir ekzosiklik amino grubu içeren, karakteristik UV spektrumuna ve yüksek ekstinksiyon katsayısına, bazıları ise fluoresans özelliğe sahip bileşiklerdir (Öz ve Kaya, 2006). HCA'lar kimyasal özelliklerine göre bazen polar (AIA'ler, Glu-P-1 ve Glu-P-2) ve apolar olarak da sınıflandırılabilir (Fay et al., 1997).

Günümüze kadar 20'den fazla heterosiklik amin farklı gıda gruplarında tanımlanmış ve kimyasal yapıları belirlenmiştir (Toribio et al., 2002). Çizelge 2.2'de aminoimidazoazaarenler ve aminokarbolinler grubunda bulunan HCA'lar gösterilmiştir (Öz ve Kaya, 2006).

Çizelge 2.2. Amino-imidazo azaarenler ve aminokarbolinler grubunda bulunan HCA'lar (Öz ve Kaya, 2006).

| <u>Aminokarbolinler</u> | | | |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|------------------|
| Kimyasal İsmi ve Sınıfı | Kısaltması | Moleküler Formülü | Molekül Ağırlığı |
| 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol | A α C | C ₁₁ H ₉ N ₃ | 183 |
| 2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol | MeA α C | C ₁₂ H ₁₁ N ₃ | 197 |
| 1-metil-9H-pirido[4,3-b]indol | Harman | | 182 |
| 9H-pirido[4,3-b]indo | Norharman | C ₁₂ H ₁₁ N ₃ | |
| 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol | Trp-P-1 | C ₁₃ H ₁₃ N ₃ | 211 |
| 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol | Trp-P-2 | C ₁₂ H ₁₁ N ₃ | 197 |
| 2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3 ₁ ,2 ₁ -d]imidazol | Glu-P-1 | C ₁₁ H ₁₀ N ₄ | 198 |
| 2-aminodipirido[1,2-a:3 ₁ ,2 ₁ -d]imidazol | Glu-P-2 | C ₁₀ H ₈ N ₄ | 184 |
| 3,4-cyclopentenopirido[3,2-a]karbazol | Lys-P-1 | C ₁₈ H ₁₄ N ₂ | 258 |
| 2-amino-5-fenilpiridin | Phe-P-1 | C ₁₁ H ₁₀ N ₂ | 170 |
| 4-amino-6-metil-1-H-2,5,10,10b-tetraazafluoranten | Orn-P-1 | C ₁₃ H ₁₁ N ₂ | 237 |
| 4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H,6Hpirolo[3,4-f]benziimidazol-5,7-dion | Cre-P-1 | | |
| <u>Aminoimidazazoarenler</u> | | | |
| 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin | IQ | C ₁₁ H ₁₀ N ₄ | 198 |
| 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin | Me IQ | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ | 212 |
| 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinokzalin | Iqx | C ₁₀ H ₉ N ₅ | 199 |
| 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin | Me Iqx | C ₁₁ H ₁₁ N ₅ | 213 |
| 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin | 4,8-DiMeIQx | C ₁₂ H ₁₃ N ₅ | 227 |
| 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin | 7,8- DiMeIQx | C ₁₂ H ₁₃ N ₅ | 227 |
| 2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-f]kinokzalin | 4,7,8-TriMeIQx | C ₁₃ H ₁₅ N ₅ | 241 |
| 2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin | MeIQx | | |
| 2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]kinokzalin | 7-9-DiMeIgQx | | |
| 2-amino-1,6-dimetil imidazo[4,5-b]piridin | 1,6DMIP | C ₈ H ₁₀ N ₄ | 162 |
| 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridin | PhIP | C ₁₃ H ₁₂ N ₄ | 224 |
| 2-amino-1-metil-66-(4-hidroksifenil)-imidazo[4,5b]piridin | 4 ₁ -OH-PhIP | | |
| 2-amino-1,5,6 trimetilimidazo[4,5-b]piridin | 1,5,6-TMIP | C ₉ H ₁₂ N ₄ | 176 |
| 2-amino-3,5,6 trimetilimidazo[4,5-b]piridin | 3,5,6-TMIP | | |
| 2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin | IFP | | |

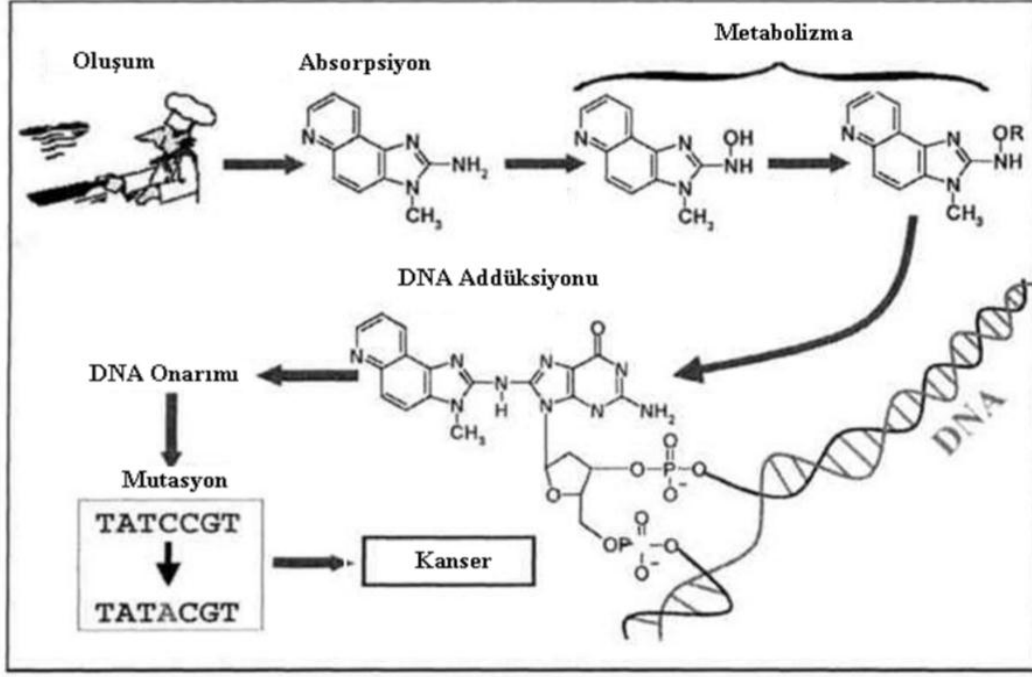
2.3.2. HCA'ların oluşum mekanizmaları

HCA'ların oluşumunda Maillard reaksiyonunun önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Birçok polar HCA'lar çiğ ette bulunan kreatin/kreatinin, serbest aminoasitler ve karbonhidrat öncü maddelerinin ısı ile reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. Kreatinin, molekülün imidazol halkasını sağlarken geri kalan kısmını da heksozlar ve aminoasitler arasında gerçekleşen Strecker degradasyon ürünleri meydana getirmektedir. Aldol kondensasyonunun bu iki parçayı Strecker aldehiti (veya Schiff bazı) aracılığıyla biraraya getirdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla ortamda kreatin/kreatinin bulunmadığı durumda IQ ve IQx formunda HCA oluşması mümkün değildir. Çoğunlukla polar olmayan HCA'lar 300°C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda, aminoasitlerin pirolizi sonucu oluşmaktadır. Ancak harman, norharman, ve Trp-P-1 düşük pişirme sıcaklıklarında oluşabilmektedir. Polar HCA'ların (IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP) evdeki pişirme işlemlerinde, 100-225°C gibi normal pişirme sıcaklıklarında oluştukları gözlenmiştir (Güven, 2009).

Esmerleşme reaksiyonunun bazı aşamalarında, pirazinler, kinoksinler ve prido[3,4-d]imidazoller oluşmaktadır ve bunlar heterosiklik amin (HCA) oluşumunda yer almaktadırlar (Morita et al., 1990; Gi et al., 1994).

HCA oluşum mekanizması şu şekilde gerçekleştirilmektedir; pişirme esnasında HCA öncül maddeleri et yüzeyine doğru ilerler ve et yüzeyinde kritik sıcaklığa yükseldiğinde et dehidre olmaya başlar, daha sonra da çeşitli kondensasyon reaksiyonları sonucunda, HCA'lar oluşmaktadır. Bunlar arasında da gıdalarda en çok 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kuinoksalin (MeIQx), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]pridin (PhIP), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kuinoksalin (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kuinolin (IQ) ve 2-amino-9H-prido[2,3-b]indol=2-amino- α -karbolin (A α C)'in bulunduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra MeIQx, 4,8-DiMeIQx ve PhIP'nin pişirilmiş etlerde en çok rastlanan HCA'lar arasında yer aldığı belirtilmiştir (Keating et al., 1999).

HCA'ler DNA'nın yapısını bozmadan önce P 450 enzimi ile N-oksidasyona, ardından da N-asetiltransferaz-2 enzimi tarafından O-esterifikasyona maruz bırakılmakta ve aktivasyon kazanarak kansere neden olmaktadır (Ekici vd., 2012). Etin pişirilmesi sırasında ortaya çıkan HCA'lerin vücutta uğradığı aktivasyon Şekil 2.3'de gösterilmiştir (Wogan et al., 2004).



Şekil 2.3. HCA'ların metabolize olması ile kanserin ortaya çıkmasının şematik gösterimi (Wogan et al., 2004)

2.4. HCA'ların Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Yapılan çalışmalara göre; kas etlerinde doğal olarak bulunan kreatin, aminoasit, şeker, aldehitler heterosiklik aminlerin oluşumunda öncül madde olarak yer almaktadırlar (Cheng et al., 2006).

Etlerin yüksek sıcaklıkta pişirilmesi sırasında Maillard reaksiyonu ve serbest radikallerin oluşmasının HCA'ların oluşumunda önemli bir etken olduğu bilinmektedir. HCA'ların çeşitliliği ve konsantrasyonlarının; etin bileşimi (pH, su aktivitesi, karbonhidratlar, serbest aminoasitler, kreatin, ısı ve kütle transferi, yağlar, yağ oksidasyonu ve antioksidanlar) yanında uygulanan pişirme koşullarına (sıcaklık, süre, pişme yoğunluğu ve pişirme yöntemi) bağlı olduğu belirtilmektedir (Öz ve Kaya, 2007; Keşkekoğlu and Üren, 2013).

2.4.1. Pişirme sıcaklığı ve süresi

Pişirme sıcaklığı ve süresinin, HCA'ların oluşumu ve miktarları üzerine, gıda ürünlerinin su içeriği veya kreatin, şekerler ve serbest aminoasitler gibi öncül bileşiklerin varlığından daha önemli etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Bordas et al., 2004).

Pişirme süresinin AIA'ların oluşumuna pişirme sıcaklığı kadar önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Pişirme sıcaklığının en önemli parametre olduğu belirtilmektedir (Lan et al., 2004).

Mutajen bileşiklerin et ve model sistemlerinde 150 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda oluşmaya başladığı belirlenmiştir. AIA'ların konsantrasyonlarının genellikle ısı işlem sıcaklığı ile arttığı tespit edilmiştir. AIA'ların oluşmalarından önce bir lag fazına sahip oldukları ve bu lag fazının et ve et ürünlerinin yüzeyinin 100–150 °C'ye ulaşması için gerekli süre ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca 100 – 150 °C sıcaklıklarda uzun süren ısı işleme maruz kalması sonrasında sadece iz miktarlarda HCA oluştuğu belirlenmiştir (Jackson and Hargraves, 1995).

2.4.2. Kreatin içeriği

Sığır, domuz, tavuk ve balık etleri gibi proteince zengin gıdaların normal pişirme sıcaklıklarında mutajenik bileşikler oluşturduğu fakat peynir, fasulye, karides ve sakatat gibi proteince zengin diğer gıdaların ihmal edilebilir seviyede mutajenik aktivite içerdiği belirtilmektedir. Mutajen oluşumundaki bu farkın gıdaların kreatin içeriğinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Karaciğer ve böbrek gibi sakatatların, ihmal edilebilecek kadar düşük seviyede kreatin içerdikleri için kızartma sonrasında önemli derecede mutajen oluşturmadıkları belirtilmektedir. Bu nedenle pişirme öncesi kreatin ve suda eriyebilen öncül bileşiklerin uzaklaştırılması mutajenik aktiviteyi azaltmak açısından önem arz etmektedir (Felton and Knize, 1991).

Felton et al. (1994)'ün yaptığı bir çalışmada kas dokusu içeren gıdaların, pişirme boyunca serbest aminoasitler ve şekerler ile reaksiyona girebilen kreatin ve kreatinin içerdiği belirtilmektedir. Kreatin, sadece omurgalı hayvanlarda kreatin fosfat formunda bulunmaktadır. Bu bileşik enerji metabolizması için gerekli olup, hayvan kesiminden sonra

24 saat içinde serbest kreatine dönüşmektedir. Genellikle, kaslar % 0,4 oranında kreatin içermektedirler. Etin mutajenik aktivitesinin temelinde kreatin bulunmaktadır. Isıl işlem boyunca kreatin, AIA'ların imidazo kısmını oluşturan kreatinine dönüşmektedir.

Yüksek işleme sıcaklıklarının kreatin miktarında hızlı bir şekilde azalışa, kreatinin miktarında ise hızlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu dönüşümün büyük kısmının ısı işlemin ilk 40 dakikasından itibaren oluştuğu belirtilmiştir (Jackson and Hargraves, 1995).

2.4.3. Yağ içeriği

Yağlar, et yüzeyinde yüksek sıcaklığa neden olan etkili bir ısı transfer ajanı olarak bilinmektedir. Ayrıca ısının et içerisinde daha etkili bir şekilde taşınmasında rol almaktadırlar. Lipid peroksidasyonu ve termal degradasyon boyunca bir takım alkoller, aldehitler, ketonlar, organik asitler ve hatta N-heterosiklikler oluşabilmektedir. Ayrıca serbest radikaller de lipid peroksidasyonu süresince oluşmakta ve bazı Maillard reaksiyonu ürünlerinde artışa neden olabilmektedir. Serbest radikallerin HCA'ların oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (Milic et al., 1993).

Johansson and Jägerstad (1993)'ın yaptığı bir çalışmada HCA'ların oluşumu üzerine demirin etkili olduğu belirlenmiştir. Kreatin, glisin ve glukoz içeren model sisteme demir (Fe^{2+} ve Fe^{3+}) ilavesinin IQx, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx oluşumunu yaklaşık iki kat artırdığını belirlemişlerdir. Demirin düşük sıcaklıklarda yağ oksidasyonunda iyi bir katalizör olduğu bilinmektedir ve demirin neden olduğu MeIQx oluşumundaki artışın demir tarafından katalize olan yağ oksidasyonu yoluyla oluşan serbest radikaller nedeniyle gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Ayrıca yağların HCA'lar üzerine artırıcı etkilerinin ısı işlemin neden olduğu yağ oksidasyonu ile oluşan serbest radikallere bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte, serbest radikallerin etkilerinin araştırılması için kurulmuş bir model sistemde yağ oksidasyon derecesinin MeIQx oluşumunu etkilemediği belirtilmiştir (Dündar, 2011).

2.4.4. Antioksidan içeriği

Vitaglione and Foglian (2004)'ün yaptığı bir çalışmada gıdaların, mutajenik aktivite ve HCA oluşumunu artırıcı veya azaltıcı etki gösteren indoller, metaller, antioksidanlar ve gıda katkıları gibi farklı bileşikleri içerdiğini belirtmişlerdir. HCA'ların oluşumunda radikal

reaksiyonların önemli rol aldığı anlaşıldığından beri, antioksidanların model sistemler, kızartılmış et ve balıklardaki HCA'ların miktarını azaltması gerektiği düşünülmüştür. Tek bir antioksidanın veya antioksidanların kompleks karışımlarının HCA'ları inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu etki, muhtemelen antioksidanların, HCA'ların oluşumlarının farklı aşamalarına dâhil olması ile açıklanmaktadır.

Murkovic et al. (1998)'in yaptığı bir çalışmada antioksidan baharatın, kızartılmış etteki HCA miktarını azaltabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar sığır etine kızartmadan önce toz halde muamele ettikleri ve 24 saat beklettikleri biberiye, kekik, adaçayı ve sarımsağın kontrol grubuna göre HCA içeriğini %60 oranında düşürdüğünü belirtmişlerdir. Kekiğin, IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, MeIQx ve PhIP bileşiklerinde %61–100, sarımsağın %32–78 biberiye ve adaçayının ise sırasıyla %38–75 ve %40–100 azalma gösterdiğini belirlemişlerdir (Dündar, 2011).

2.4.5. Aminoasit içeriği

Et ve et ürünlerinin pişirilmesi sırasında toplam aminoasit miktarı yükselen sıcaklıkla birlikte azalmaktadır. Bazı aminoasitlerin (glutamik asit, izolösin, tirozin, treonin, serin, fenilalanin) yıkıma uğraması veya glukoz ile reaksiyona girmesi sonucunda HCA oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Liao et al., 2009).

Farklı aminoasitlerin kreatinin ve glukoz ile 130° C'de 2 saat boyunca ısıl işleme tabi tutulması ile farklı seviyelerde mutajenik aktivite oluşturulması sağlanmıştır. Mutajenik aktivitenin farklı aminoasitler için farklı düzeylerde olduğu ve en yüksek mutajenik aktivitenin sırasıyla treonin, glisin ve lisinde olduğu belirlenmiştir (Jägerstad et al., 1983).

2.4.6. Su içeriği

Skog et al. (1998)'in yapmış olduğu bir çalışmada etin yapısındaki suyun, suda çözünen öncü maddelerin etin yüzeyine transferini sağlaması sebebiyle HCA oluşumunda etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Kıyılmış ette doku parçalandığı için açığa çıkan su miktarının fazla olduğunu ve bu sebeple formülasyona suyu bağlayıcı maddeler (tuz, soya proteini, kazein, nişasta) katılmasının HCA oluşumunu azaltıcı etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Et ve/veya et ürünlerinin su içeriğinin ısıtma işlem sonucu oluşabilecek HCA'ların miktarını azaltılabileceği belirtilmiştir. Bratwurst adı verilen yüksek su içeriğine sahip bir sosise türünde diğer et ürünlerine nazaran daha düşük seviyede HCA oluşumu tespit edilmiş ve bu durum ürünün yüksek su içeriği ile açıklanmıştır (Basira, 1998).

2.4.7. Pişirme metodu

Skog et al. (1997)'nin yaptığı bir çalışma da HCA oluşumunun pişirme sıcaklığının düşük ve sabit tutulması ve aynı zamanda kızartma sırasında ani sıcaklık yükselmelerinden kaçınılması durumunda HCA'ların azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Izgara yapılmış etlerin mutajenik aktivitesinin pişirme boyunca ulaşılan yüzey sıcaklığı ile olduğu ve et doğrudan ateş üzerinde pişirildiğinde tavada kızartmaya kıyasla çok daha hızlı bir şekilde mutajenler oluştuğunu belirtmişlerdir. Fırında rostito işleminin tavada kızartmadan daha az HCA oluşturduğunu bildirilmişlerdir.

2.4.8. Gıda katkı maddeleri

Etin yapısındaki suyun, suda çözünen öncü maddelerin etin yüzeyine transferini sağlaması sebebiyle HCA oluşumunda etkisi olduğu belirtilmektedir. Kızartılmış ette doku parçalandığı için açığa çıkan su miktarı fazladır. Bu sebeple formülasyona suyu bağlayıcı maddeler (tuz, soya proteini, kazein, nişasta) katılması HCA oluşumunu azaltıcı etki göstermektedir. Askorbik asit, bisülfid, nitrit, vitamin E katılması kızartma sırasında oluşan IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx oluşumunu önlemektedir. İndirgen ajanların önleyici etkisinin şelat ajanlarının önleyici etkisinden daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Skog et al., 1998).

2.5. Heterosiklik Aminlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

HCA'ların mutajenitelerinin belirlenmesinde 1975'li yıllarda tanımlanmış olan Ames/*Salmonella* testi kullanılmaktadır. Pişmiş et örneklerindeki mutajenik yapılar ile HCA aktiviteleri karşılaştırıldığında birçok örnekteki mutajenik aktivitenin kaynağı tam olarak açıklanamamıştır. Açık alev ortamında pişirilen etlerde oluşan HCA'lar haricinde diğer bileşiklerin de araştırılması gerekmektedir. Birçok epidemiyolojik çalışmada günlük et alımı ile kanser arasında bir ilişki olduğu bildirilmiş olmasına rağmen kanser oluşumunun etlerle alınan HCA'larla bağlantı kurmanın zor olduğu bildirilmiştir. Isıtma işlem görmüş et ve et

ürünlerinde oluşan nitrozamin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs), akrilamid bileşikleri ile kişinin yüksek oranlarda yağ ve tuz alımı, fiziksel aktivite ve diğer bütün faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Keşkekoğlu, 2012).

Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2 ve Glu-P-1'yi grup "2B" yani insanda kanserojenik etki yapma olasılığı bulunan bileşikler grubuna, IQ'da grup "2A" daha düşük olasılıklı kanserojen riski grubuna koyulduğunu bildirmiştir. MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2 ve Glu-P-1 mutajen etki gösteren HCA bileşikleridir. Harman ve norharman ise ko-mutojendir ve Trp-P-1, Trp-P-2'nin etkisini arttırmaktadır (Skog et al.,1998; Toribio et al., 2007).

Evde pişirilmiş etlerde bulunan ve 2B grubunda yer alan PhIP ve MeIQx'in mutajenik etkisinin ürünün toplam mutajenik etkisinin yaklaşık %90'ı oranında olduğu belirtilmektedir (Pfau et al., 2006).

HCA'lar *Salmonella typhimurium*'da yüksek mutajenik etki göstermektedir. Memeli hücreleri için *in-vivo* ve *in-vitro* olarak mutajen özellik göstermektedir. HCA içeren bir diyetle beslenen kemirgenlerde kolon, göğüs ve prostat kanseri belirtileri gözlenmiştir. Bugüne kadar tespit edilen HCA'ların 10 tanesinin kemirgenlerde kanserojen özellikte etki gösterildiği bildirilmiştir (Murkovic, 2004).

Epidemiyolojik çalışmaların yaklaşık %70'inde kolon, göğüs ve mide kanserleri ile HCA'lar arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Ancak epidemiyolojik çalışmaların sonuçları birbirini tam olarak doğrulayamamaktadır. Ancak HCA ile kanser ilişkisi hala sorgulanmaya devam etmektedir (Ekici vd., 2012).

2.6. Heterosiklik Aminleri Tespit Metotları

Heterosiklik aminler kompleks örnek matrislerinde ve düşük düzeylerde (ng/g) düzeyinde bulduklarından, bu bileşiklerin belirlenebilmesi için etkin bir saflaştırma basamağına ve duyarlı, seçici bir analitik yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Bu amaçla çok sayıda ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemi belirlenmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME) veya immunoaffinite saflaştırma yöntemlerinden biri örnek hazırlama aşamasında kullanılmaktadır. Heterosiklik

aminlerin belirlenebilmesi için genellikle zıt-faz yüksek performans sıvı kromatografisi ile beraber DAD, floresans dedektör, elektrokimyasal dedektör veya kütle spektrometresi kullanılmaktadır (Öz ve Kaya, 2006).

Sıvı kromatografisi (LC), son yıllarda ekstraksiyon, saflaştırma ve uygun çözümlenmiş HCA'ların belirlenmesinde kullanılan kromatografik bir yöntemdir. Bazı HCA'ların tanımlanmasında LC ile birlikte DAD kullanılırken, bazılarında (nonpolar HCAs ve PhIP) ise daha hassas olan floresans dedektörler kullanılmaktadır. Bu dedektörler daha basit kimyasal model sistemlerde doğru sonuçlar vermektedir. Bu iki dedektör yanısıra kompleks örnek matrislerinde daha seçici ve duyarlı olan elektrokimyasal dedektörler (ECD) ve kütle spektrometreleri (MS) de kullanılmaktadır (Cheng et al., 2006).

Sanz Alaejos et al. (2008)'in yaptığı bir çalışmada HCA'ların kromatografik analizi öncesindeki en önemli işlem basamağının söz konusu bileşenlerin etkin bir şekilde ekstraksiyon aşaması olduğunu belirtilmiştir. Gıdaların kompleks yapısı, HCA'ların genelde iz miktarda (ng/g seviyesinde) bulunmaları ve aynı zamanda kromatogramda benzer alıkonma sürelerinde HCA bileşiklerinin yanısıra farklı bileşenlerin pikleri de elde edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı ekstraksiyon aşamalarının önemini arttırdığını belirtmişlerdir.

Panize and Knize (2000)'in yaptığı bir çalışmada ise, ısıl işlem görmüş et ve et ürünlerinde oluşan HCA'ların tespiti için 1980'lerden günümüze kadar birçok bilim adamı tarafından, farklı kromatografik yöntemler kullanıldığı belirtilmiştir. Gıdaların kompleks yapısı, HCA'ların düşük miktarlarda oluşumu ve HCA'ların izolasyonunun zor olması nedeniyle kromatografik açıdan etkin ve verimli ekstraksiyon, saflaştırma ve tespit yöntemlerinin geliştirildiğini belirtmişlerdir. Dünya genelinde HCA'ların tespiti konusunda yapılan birçok literatür çalışmasında ise sıklıkla, HPLC ve DAD kullanıldığını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Denemelerde kullanılan örnekler piyasada bulunan 10 farklı firmaya ait dana etine ait fermente sucuk örnekleridir. Denemeler ve paraleller arasında uyum sağlamak amacıyla sucuk örnekleri analize alınmaya kadar -18 °C'de saklanmıştır. Örneklerin hepsi raf ömrünün başındadır. Sucuk örnekleri 3 mm olacak şekilde dilimlenmiştir. Sucuk örnekleri elektrikli ocakta orta derecede, yağsız tavada (tam orta 3 köşesinde, iki yüzüde) pişirme yöntemi ile az (90 saniye)-orta (180 saniye)-çok (300 saniye) pişmiş olacak şekilde pişirilmiştir. Az-orta-çok pişmiş sucukların merkez sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Kullanılan bütün kimyasallar ve solventler analitik saflıkta veya HPLC saflıktadır. Ultra saf su (Human marka saf su ile elde edilen) kullanılmıştır. Mobil faz hazırlanırken kullanılan bütün solüsyonlar kullanılmadan önce mavi bant süzgeç kâğıdından süzülmüştür.

Standart olarak kullanılan HCA'lar: 2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) ve 1-methyl-9Hpyrido[4,3-b]indole (harman) Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada); 9H-pyrido[4,3 b]indole (norharman) Sigma (Switzerland) markaları kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu için Oasis MCX kartuş (3 ml/60 mg, 30 µm) Waters (Ireland) ve Bond Elute C₁₈ kartuş (3 ml/100 mg) Agilent (USA) çalışılmıştır.

Methanol HPLC saflıkta, asetonitril, asetik asit, amonyak (25%, w/w), hidroklorik asit (HCl) (%37, w/w), amonyum asetat Merck marka kullanılmıştır.

3.1.2.Kullanılan cihazlar

Kromatografik ayırım için Agilent 1200 HPLC cihazı (Santa Clara, USA), kolon olarak BDS HYPERSIL C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Dedektör olarak diode array dedektör (DAD) ve fluoresans dedektör kullanılmıştır.

Mobil faz pH ayarlamasında Hanna HI-221 pH metre kullanılmıştır.

Çözünür protein tayininde Cary 50 UV-visible (Varian) spektrofotometre kullanılmıştır.

Protein tayininde LECO FP-528 Dumas protein cihazı kullanılmıştır.

Tavada pişirme 15 cm orta boy tava kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Pişirme sırasında Protek 506 Digital Multimeter ile sucukların merkez sıcaklığı ölçülmüştür.

HCA analizinde IEC CL31 - CL31R Multispeed modeli santrifüj cihazı kullanılmıştır.

Nem analizi için Nüve ES500 etüv cihazı kullanılmıştır.

3.2.Metot

3.2.1. Deneme deseni

Analizler piyasada bulunan 10 farklı firmaya ait fermente sucuk (dana eti) örnekleri temin edilerek yapılmıştır. Sucuk örnekleri tavada pişirme yöntemi ile az (90 saniye)-orta (180 saniye)-çok (300 saniye) pişmiş olacak şekilde pişirilmiştir ve Çizelge 3.1'deki gibi deneme deseni oluşturulmuştur. Pişirme işlemleri 2 tekrar, analizler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme deseni

| GERÇEKLEŞTİRİLEN ANALİZLER | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| • Pişmiş sucuk örnekleri | *HCA analizi *Çözünür protein analizi |
| • Çiğ sucuk örnekleri | *Nem içeriği *Protein tayini *Yağ tayini *Kül Analizi *pH Analizi |

3.2.2. HCA analizi**3.2.2.1. HCA standartlarının hazırlanması**

Öncelikle her bir HCA'dan 100 mg/L stok çözeltiler metanolde hazırlanmıştır. Daha sonra her birisinden 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L ve 10 mg/L metanolde standart çözeltiler hazırlanmış ve bunlara göre her bir HCA için standart kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.2. Sucuk örneklerinden HCA'ların ekstraksiyonu

Dört g sucuk örneği 25 ml 0,2 M HCl ile homojenize edilip (Ika T25 Ultra-Turrax, 25000 devir/dk, Almanya) karışım 250 ml'lik erlene aktarılmıştır. Erlene alınan karışımlar 1 saat süreyle çalkalama cihazında (Daihan SHO-2D) çalkalandıktan sonra karışıma 1 ml Carrez I ilave edilip 2 dk çalkalanmış, ardından 1 ml Carrez II ilave edilip 2 dk daha çalkalanmıştır. Karışım Whatman (40) süzgeç kâğıdından süzöldükten sonra süzöntü iki eşit kısma ayrılmıştır. Her iki porsiyon ayrı ayrı safsızlıklardan kurtulmak için Bond Elute C₁₈ SPE kartuştan geçirilmiştir. Bu amaçla C₁₈ kartuşlar önce 2 ml 0,1 M HCl ile şartlandırılmıştır. C₁₈ kartuştan geçirilen çözeltiler 2 ml 0,1 M HCl ile şartlandırılan OASIS MCX katı faz ekstraksiyon kartuşuna gönderilmiştir. Bu kartuşta tutulan HCA'lar 2 ml 0,1 M HCl ve ardından 2 ml metanol ile yıkanmış ve kartuşta kalan çözeltiler basınçlı hava ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında kartuşta tutulmuş olan HCA'lar 3 ml metanol/NH₃

(%25) (19/1) çözeltisi ile tüplere alınmıştır. Tüplerdeki çözgen azot gazı altında uçurulduktan sonra kalıntı 0,5 ml metanolde çözülmüştür. Çözelti 0,45 µm lik filtreden süzöldükten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir

3.2.2.3. Kromatografik koşullar

Dedektör olarak MeIQx, 4,8-DiMeIQx ve IQ bileşikleri için DAD dedektör, PhIP, norharman ve harman için ise floresans dedektör kullanılmıştır. Dalga boyu olarak MeIQx ve 4,8-DiMeIQx 263 nm’de, IQ ise 254 nm’de çalışılmıştır. Floresans dedektörde uyarma dalga boyu 340 nm ve emisyon dalga boyu 370 nm olarak seçilmiştir. DAD dedektör ile yapılan analizde hareketli faz olarak A: %25 lik NH₃ ile pH’sı 5,0’e ayarlanmış metanol/asetonitril/su/asetik asit (8/14/76/2, v/v/v/v) çözeltisi ve B: asetonitril kullanılmıştır. Uygulanan gradient programı Çizelge 3.2’de gösterildiği gibidir. Enjeksiyon miktarı 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2. DAD dedektörde kullanılan dereceli elüsyon programı

| Zaman | A Solventi (%) | B solventi (%) | Akış hızı (ml/dk) |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 | 100 | 0 | 0,3 |
| 12 | 100 | 0 | 0,3 |
| 20 | 70 | 30 | 0,3 |
| 29 | 70 | 30 | 0,3 |
| 34 | 0 | 100 | 0,3 |
| 35 | 0 | 100 | 1 |
| 44 | 0 | 100 | 1 |
| 49 | 100 | 0 | 0,3 |
| 55 | 100 | 0 | 0,3 |

PhIP, norharman ve harman analizinde hareketli faz olarak A: 0,5 M amonyum asetat ve B: metanol kullanılmıştır. Gradient program Çizelge 3.3’deki gibi ayarlanmıştır. Enjeksiyon miktarı 15 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Flouresans dedektörde kullanılan dereceli elüsyon programı

| Zaman | A Solventi (%) | Akış hızı (ml/dk) |
|-------|----------------|-------------------|
| 0-10 | 90-75 | 0,5 |
| 10-15 | 75-0 | 0,5 |
| 15-20 | 0 | 0,5 |
| 20-22 | 0-90 | 0,5 |
| 22-27 | 90 | 0,5 |

3.2.3. Diğer analizler

3.2.3.1. Çözünür protein analizi

Et ürünlerinde Bradford (1976)'un geliştirdiği yönteme göre çözünür protein analizi yapılmıştır. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesinin proteinlere bağlanması prensibine dayanır. Boyar madde, arjinin başta olmak üzere daha çok bazik ve aromatik aminoasitlerle reaksiyona girmekte olup yöntemin duyarlılığı asidik proteinler için daha düşüktür. Protein standardı olarak kullanılan maddelerden bovine serum albümin (BSA) ortalama proteinlere göre ve immünoglobulin G (IgG – bovine γ -globulin)'ye göre iki kat daha büyük yanıt vermektedir. Coomassie Brilliant Blue G-250 asidik çözeltilerde 465 nm'de absorpsiyon yapmaktadır. Boyar maddenin proteine bağlanması sonucunda mavi renkli bir ürün oluşmakta ve absorpsiyon dalga boyu 595 nm'ye kaymaktadır. 595 nm'deki absorpsiyon artışı saptanarak ortamdaki çözünür protein miktarı tayin edilmektedir. Reaksiyon çok hızlı olup boyar maddenin proteine bağlanması 2 dk gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşir. Oluşan mavi renkli bileşik kararlı olup 1 saat kadar dayanır. Girişim yapan maddeler hemen hemen yoktur ve reaksiyon sadece ortamda bulunabilecek deterjanlardan etkilenebilir. Bu nedenle kullanılan kaplar saf su ile gayet iyi durulanmalıdır. Spektrofotometrede ölçüm yapılırken cam veya polistiren küvetler kullanılabilir. Boyar madde küvetleri boyadığından kullanılıp atılabilir küvetlerin kullanılması önerilmektedir. Cam veya plastik küvetler üzerindeki boya kalıntıları metanol veya deterjan çözeltisi ile yıkanmalıdır. Kuvars küvet kullanılmamalıdır.

Bradford Reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml %95 lik etanolde çözülür. 100 ml %85 lik (w/v) fosforik asit ilave edilir ve boyar madde tamamen çözüldükten sonra saf suyla 1 litreye tamamlanır. Açık kahve renkli çözelti Whatman (40) süzgeç kâğıdından süzildükten sonra kullanılır. Oluşabilecek mavi renkli çökeltiyi uzaklaştırmak için çözeltiyi daha sonra süzmek gerekebilir. Bu reaktif koyu renkli şişede ve oda sıcaklığında saklanır ve birkaç hafta kadar dayanmaktadır.

Bovine serum albümini (BSA) standardından 50 mg tartılıp 50 ml saf suda çözülür ve bu stok çözelti 20 °C da saklanır. Protein standardının (BSA) nem içeriği depolama sırasında değiştiğinden stok protein çözeltisinin derişimi 280 nm'deki absorpsiyonu ölçülerek kontrol edilmelidir (bu dalga boyunda kuvars küvet ile çalışılmalıdır). BSA stok çözeltisinin absorbansı 1 cm ışın yollu küvette 0,66 olmalıdır. Bu çözeltiden tüplere 0, 10, 30, 50, 80, 100 µl alınıp saf su ile 100 µl ye tamamlanır. Bu çözeltilere 5'er ml Bradford reaktifi eklenir ve tüpler alt üst edilerek yavaşça karıştırılır. 5 dk bekledikten sonra çözelti tekrar alt üst edilerek karıştırılır ve 595 nm de absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturulur.

Örneklere bulunan çözünür proteini ekstrakte etmek için; 0,3 M NaCl, 0,02 M KH_2PO_4 , 0,02M K_2HPO_4 ve 1 g/l EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi hazırlanır. 0,1 M NaOH ile bu çözeltinin pH'sı 7 ye ayarlanır.

Sucuk örneklerindeki protein miktarını belirlemek için; 2 g örnek tartılıp, üzerine 20 ml ekstraksiyon çözeltisinden ilave edilerek blendırda 3 dk süreyle parçalanmıştır, ardından manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılmıştır. 10 000 devir/dk da 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu çözeltiden 100 µl alınarak, üzerine 5 ml Bradford reaktifi eklenip karıştırılarak 5 dk sonra 595 nm'de örneğin absorbansı okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi yardımıyla örneklerin çözünür protein içeriği hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çiziminde referans madde olarak BSA kullanıldığından kalibrasyon eğrisinden elde edilen sonuçlar iki ile çarpılmıştır.

3.2.3.2. Protein analizi (% , w/w)

Protein analizi, Dumas Yöntemi ile Anon. (2000)'a göre yapılmıştır. Şekil 3.1'de protein analizinde kullanılan Dumas cihazı gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Protein analizinde kullanılan LECO FP-528 Dumas cihazı

3.2.3.3. Kül analizi (% , w/w)

Kül analizi, gravimetrik yöntem ile AOAC (1990)'a göre yapılmıştır.

3.2.3.4. Yağ analizi (% , w/w)

Yağ analizi kloroform-metanol (Gravimetrik yöntem) yöntemi ile Folch (1957)'a göre yapılmıştır.

3.2.3.5. Nem analizi (% , w/w)

Nem analizi, gravimetrik yöntem (Etüv) ile Anon. (2001)'e göre yapılmıştır.

3.2.3.6. pH analizi

pH analizi, pHmetre ile Cemeroğlu (2007)'a göre yapılmıştır.

3.2.3.7. İstatistiksel analiz

Sonuçların değerlendirilmesinde bir istatistik paket programı kullanılmıştır. Analizler iki tekrar, üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Varyans analizi (ANOVA), Duncan testi, Pearson korelasyon testleri uygulanmıştır ($P < 0,05$).

3.2.3.8. HPLC’de heterosiklik amin (HCA) analiz yönteminin validasyonu

HCA analiz yönteminin validasyonu Özdestan et al. (2014)’ün yaptığı çalışma referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.4’de ekstraksiyon metodunun performans özellikleri gösterilmiştir.

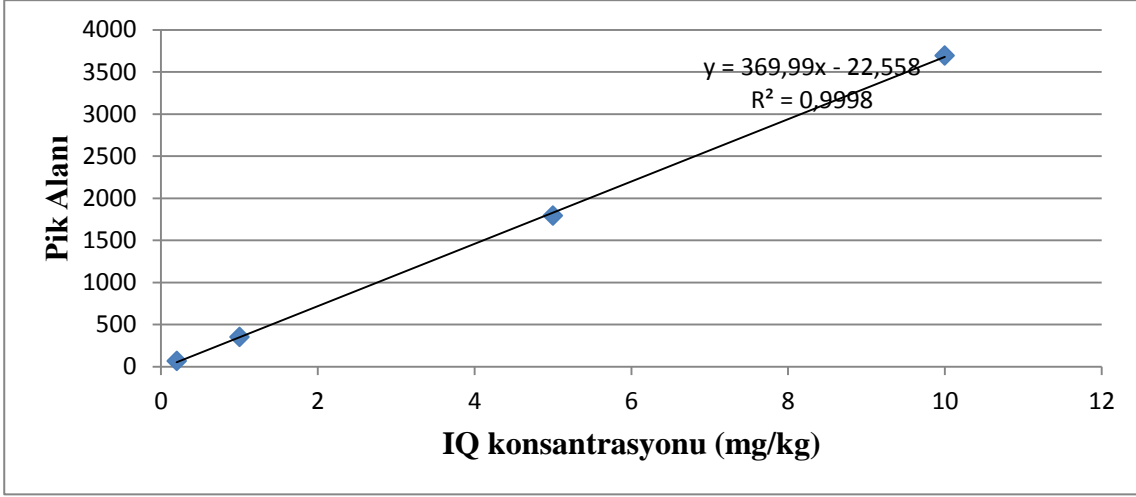
Çizelge 3.4. Ekstraksiyon metodunun performans özellikleri (Özdestan et al., 2014)

| HCA | Tespit limiti (ng/g) | Kantitasyon sınırı (ng/g) | Geri kazanım değerleri (%) |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| IQ | 0,27 | 0,80 | 73,9 |
| MeIQx | 0,86 | 2,59 | 87,8 |
| 4,8-DiMeIQx | 1,40 | 4,40 | 68,9 |
| PhIP | 0,04 | 0,13 | 76,3 |
| Harman | 0,65 | 1,96 | 85,0 |
| Norharman | 0,26 | 0,79 | 87,7 |

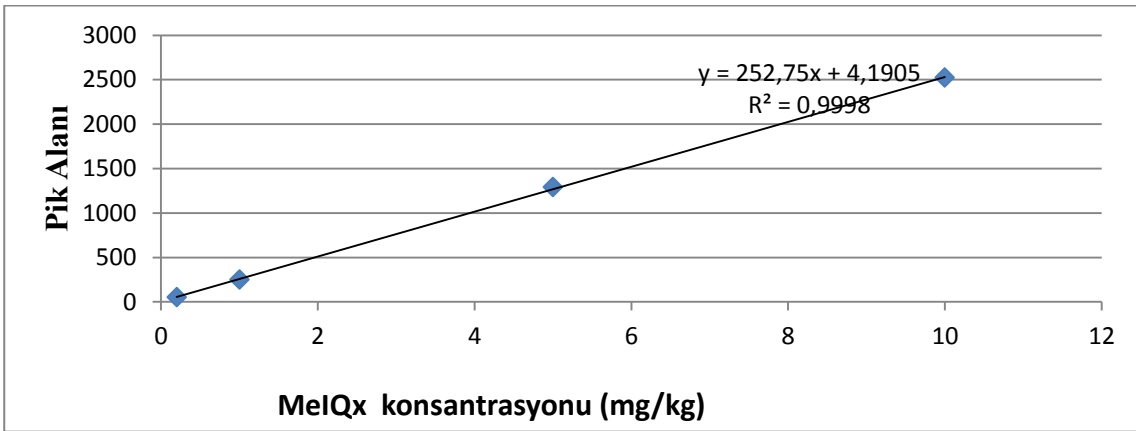
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması

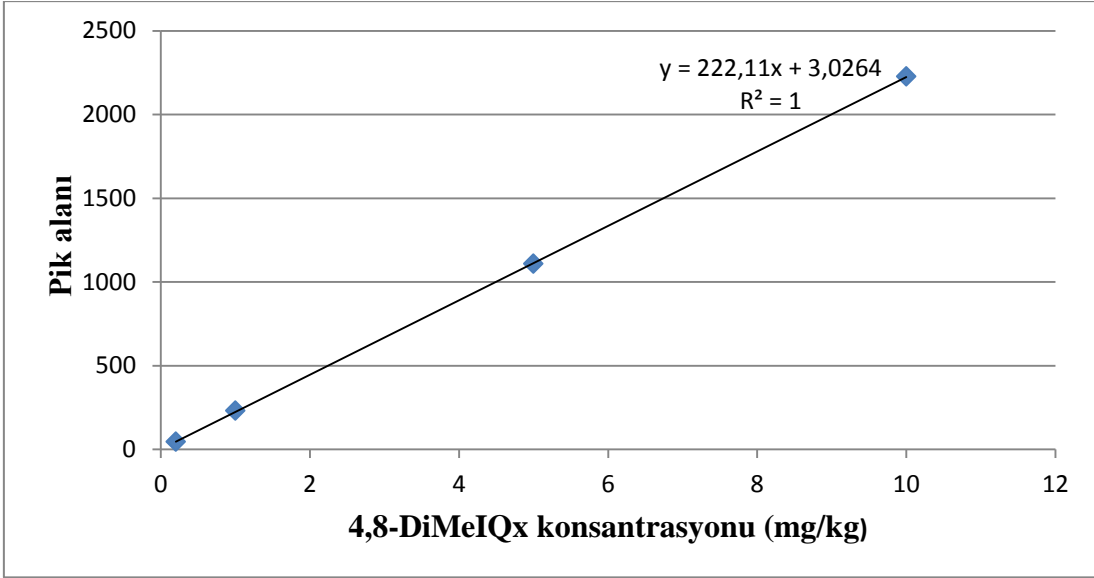
Pişmiş sucuk örneklerinin HCA içeriklerinin hesaplanması için 100 ppm'lik stok HCA karışım çözeltisi (IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, norharman, harman ve PhIP) hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm'lik standart HCA çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir HCA için kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve sonuçlar bu kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır. Şekil 4.1; 4.2; 4.3; 4.4; 4.5 ve 4.6'de standart HCA'lara ait kalibrasyon grafikleri verilmiştir.



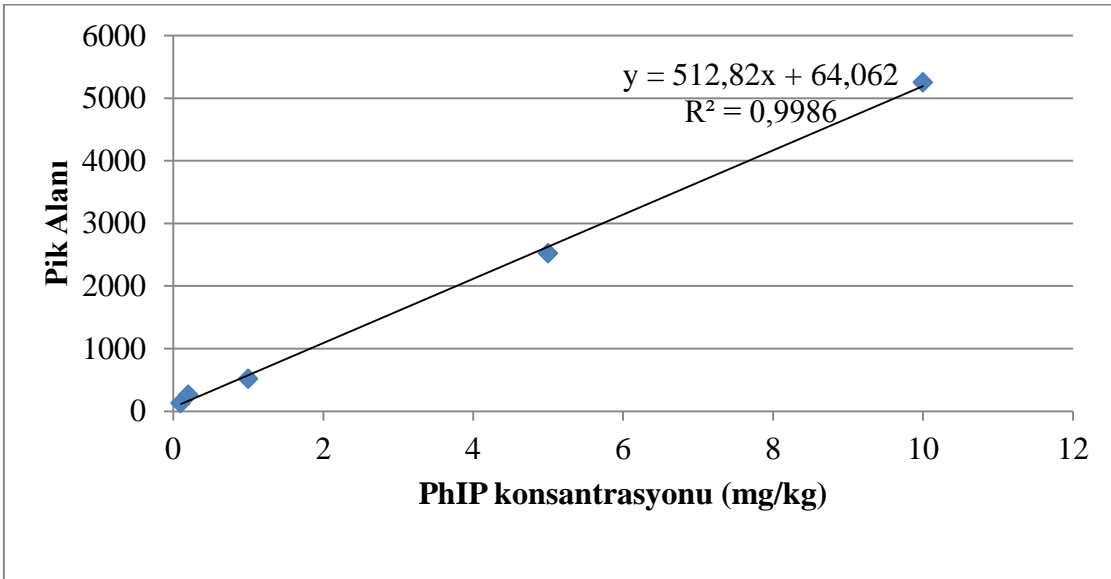
Şekil 4.1. IQ bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği



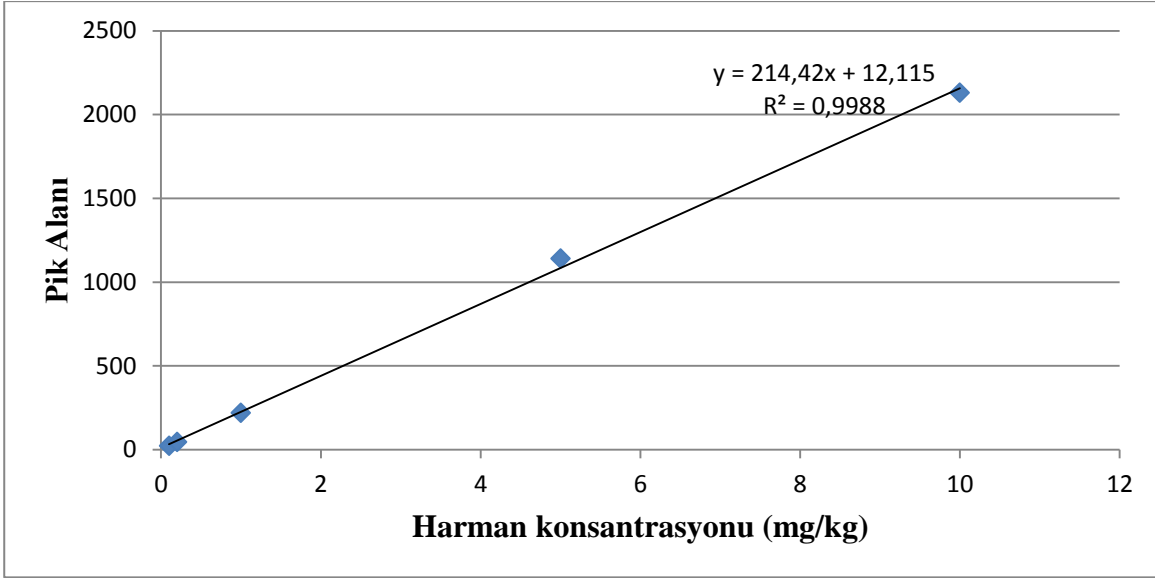
Şekil 4.2. MeIQx bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği



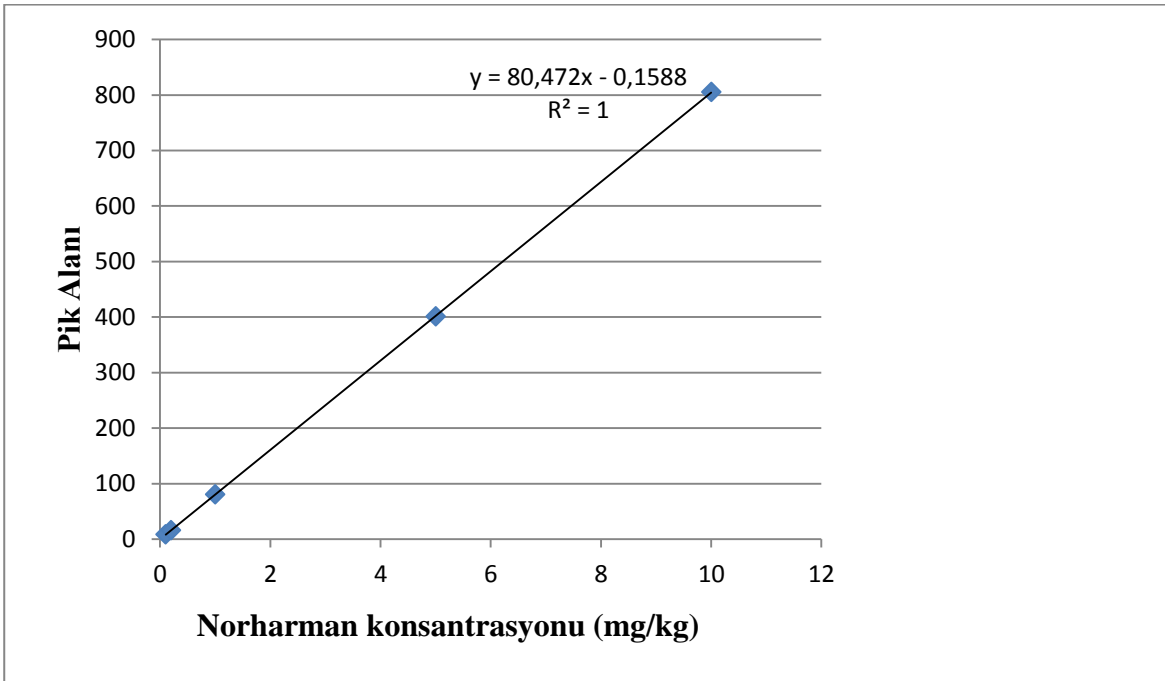
Şekil 4.3. 4,8-DiMeIQx bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği



Şekil 4.4. PhIP bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği



Şekil 4.5. Harman bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği



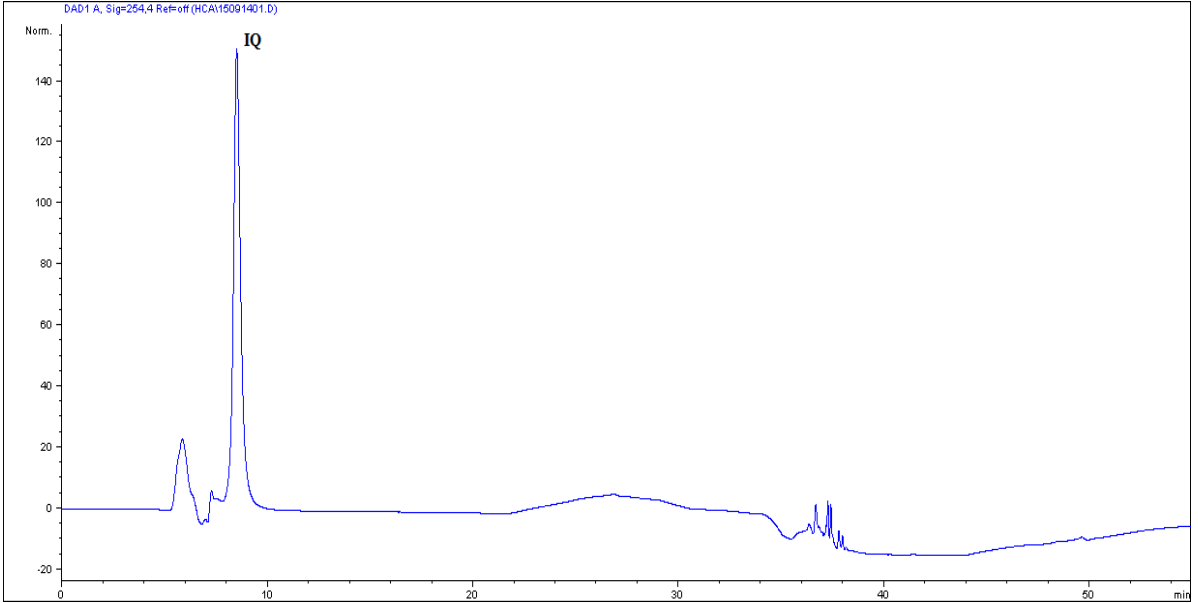
Şekil 4.6. Norharman bileşiğine ait olan kalibrasyon grafiği

Yapılan denemelerde HCA piklerinin alıkonma dakikaları floresans dedektörde okunan PhIP için 18,42 dk, norharman için 18,92 dk ve harman için 19,09 dk olarak belirlenmiştir. DAD dedektörde çalışılan IQ için 9,91 dk, MeIQx için 11,31 dk ve 4,8-DiMeIQx için ise 17,31 dk olarak belirlenmiştir.

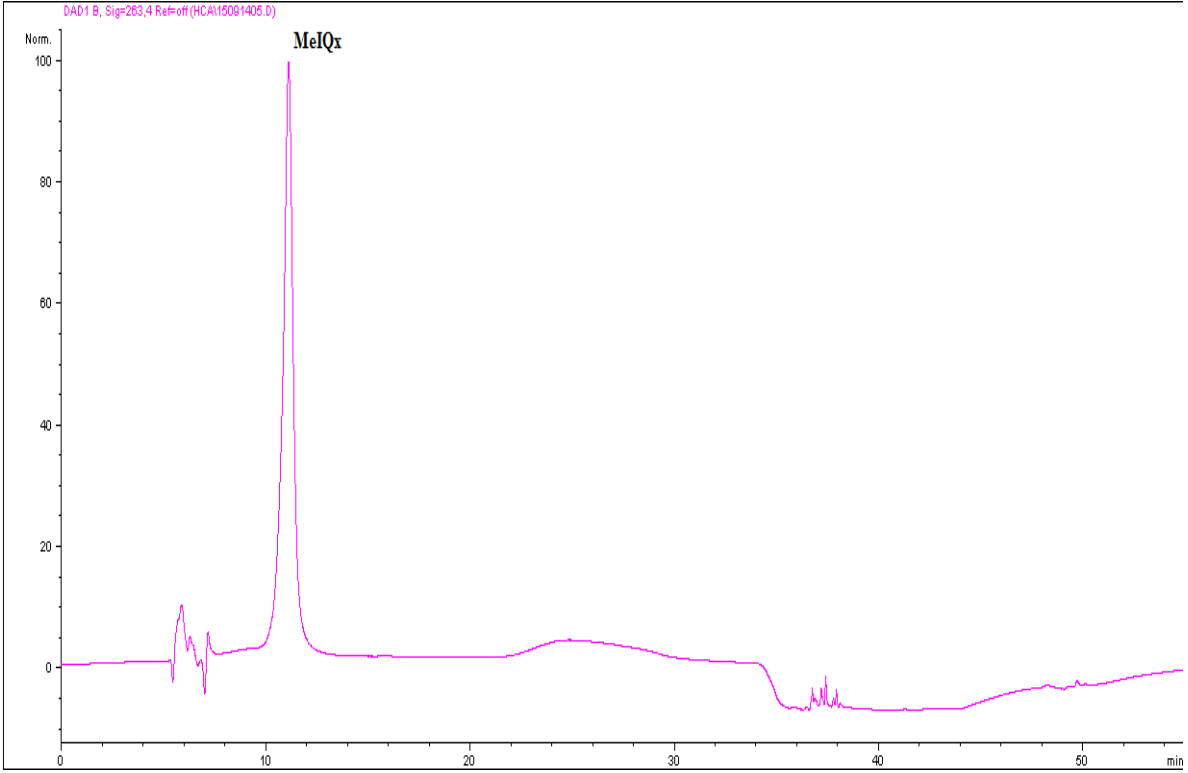
Floresans dedektörde uyarıcı dalga boyu olarak 340 ve 370 nm'ler kullanılmış olup en uygun pikler 340 nm'de elde edilmiştir. PhIP, norharman ve harman hesaplamalarında 340 nm'ye ait pikler kullanılmıştır.

DAD dedektörde, çalışılan altı HCA'nın ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ancak PhIP, norharman ve harman için floresans dedektörde daha güçlü sinyaller elde edildiği için, DAD dedektörde sadece IQ, MeIQx ve 4,8- DiMeIQx değerlendirmeleri yapılmıştır.

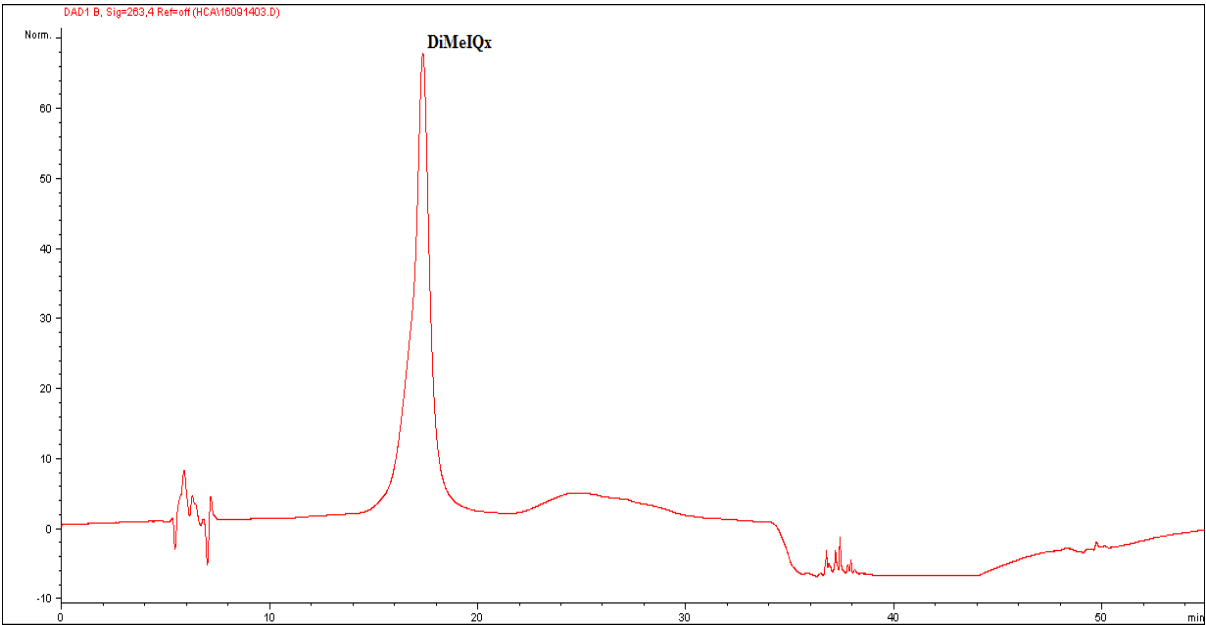
DAD dedektördeki çalışmalarda dalga boyu olarak 254 ve 263 nm'ler seçilmiş olup, IQ için 254 nm; MeIQx ve 4,8-DiMeIQx için ise 263 nm'deki piklerin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.7, 4.8, 4.9'da IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx bileşiklerine ait kromatogram görünümleri verilmiştir. Şekil 4.10, 4.11, 4.12'de PhIP, harman ve norharmana ait kromatogramlar verilmiştir.



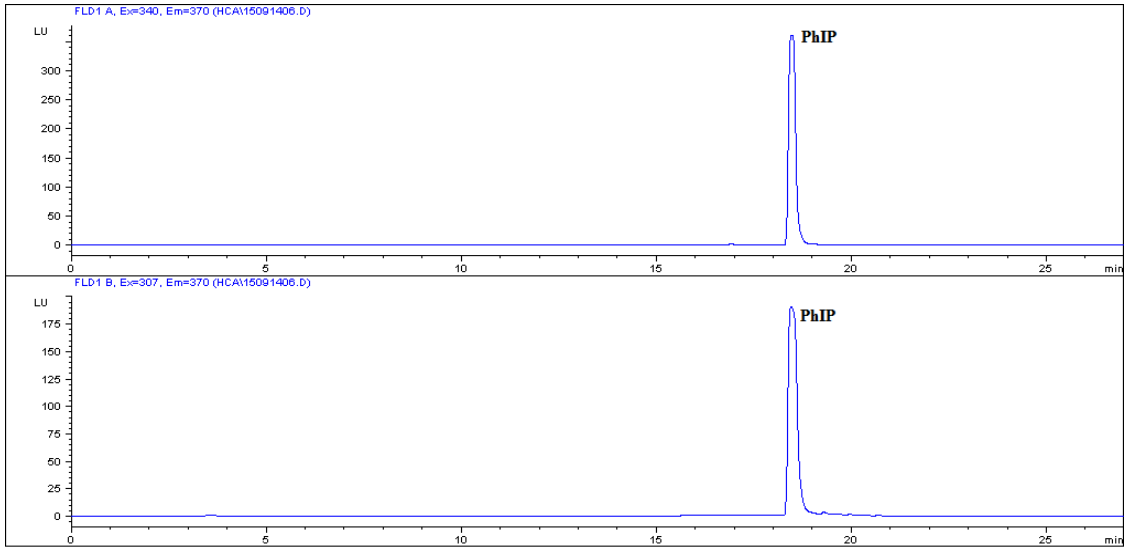
Şekil 4.7. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik IQ bileşiği standardının HPLC kromatogramı



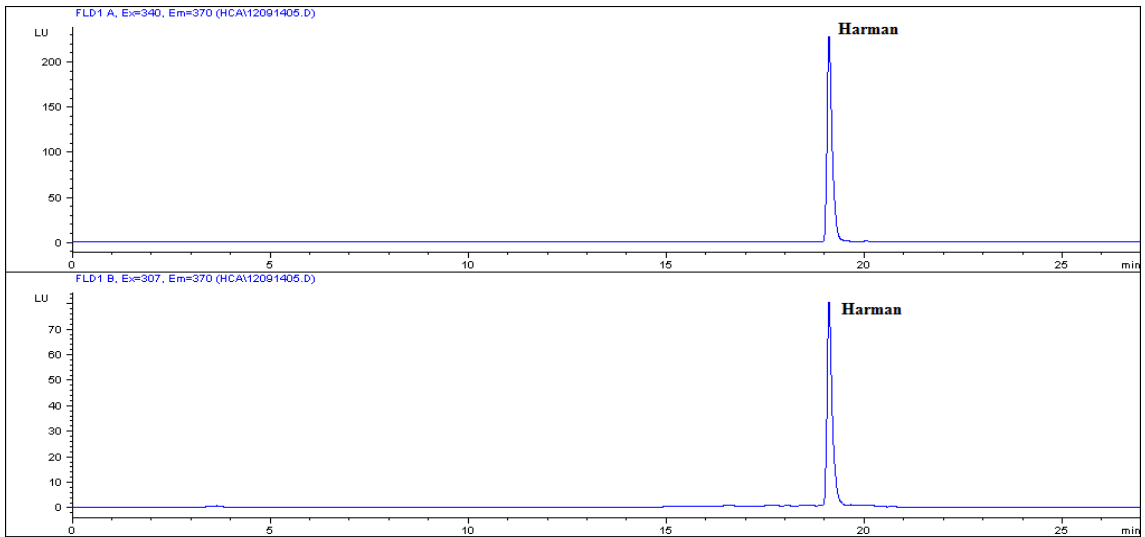
Şekil 4.8. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik MeIQx bileşiği standardının HPLC kromatogramı



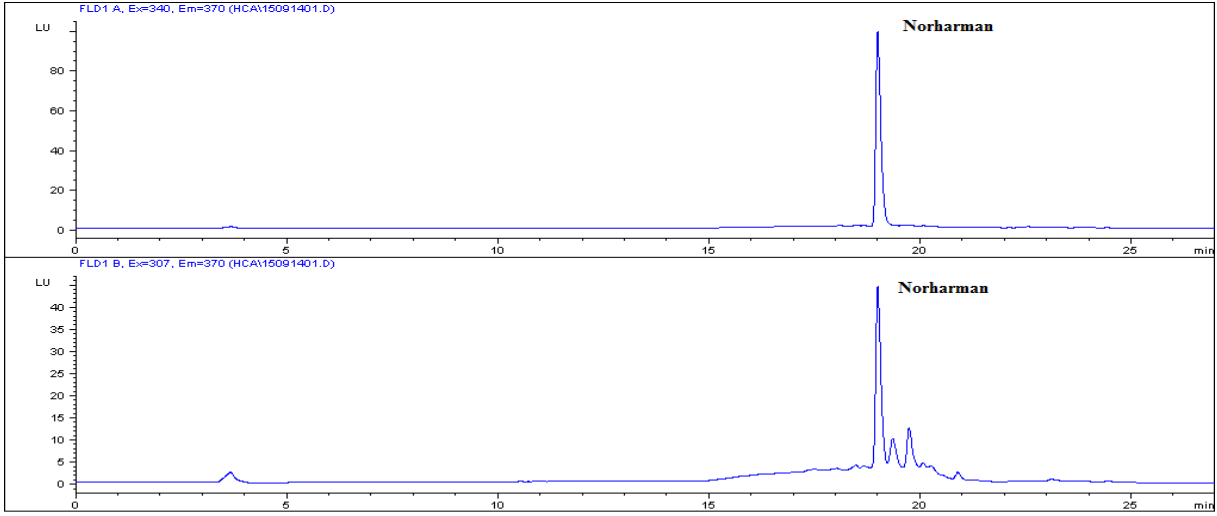
Şekil 4.9. DAD dedektöre ait 10 ppm'lik 4,8-DiMeIQx bileşiği standardının HPLC kromatogramı



Şekil 4.10. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik PhIP bileşiği standardının HPLC kromatogramı

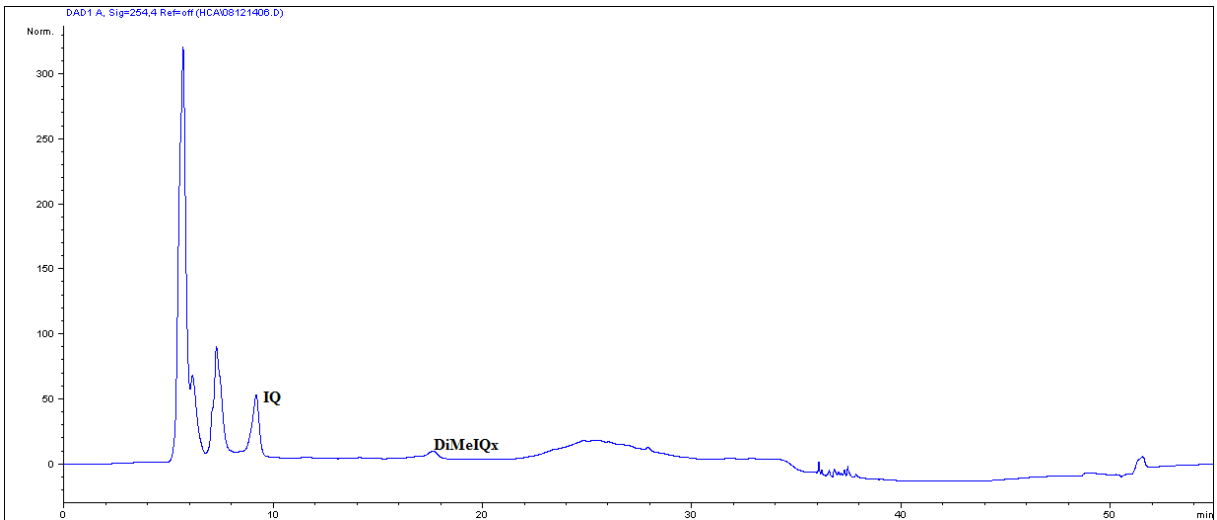


Şekil 4.11. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik Harman bileşiği standardının HPLC kromatogramı

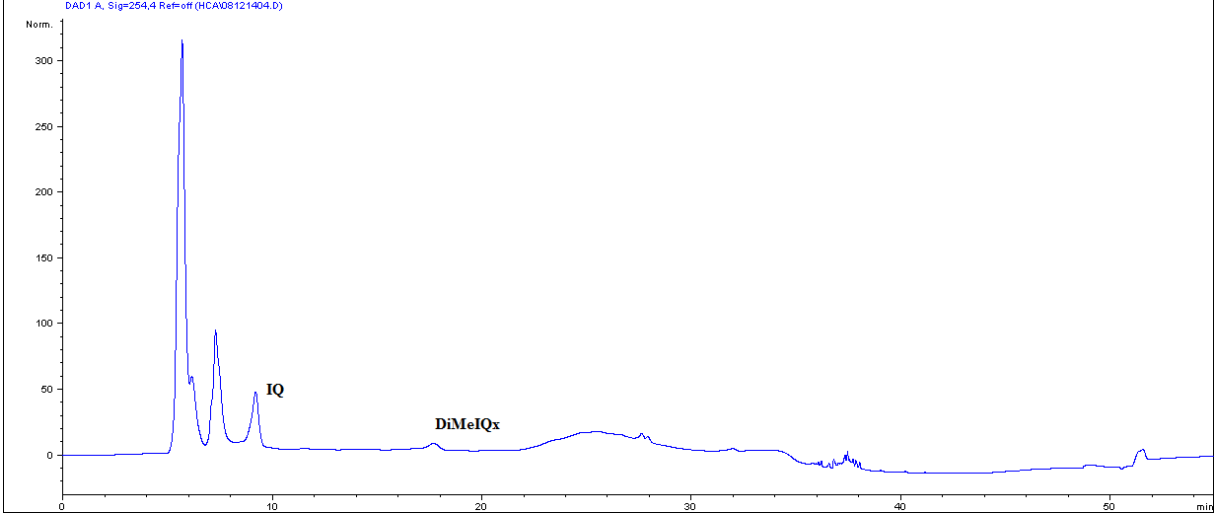


Şekil 4.12. Floresans dedektöre ait 10 ppm'lik Norharman bileşiği standardının HPLC kromatogramları

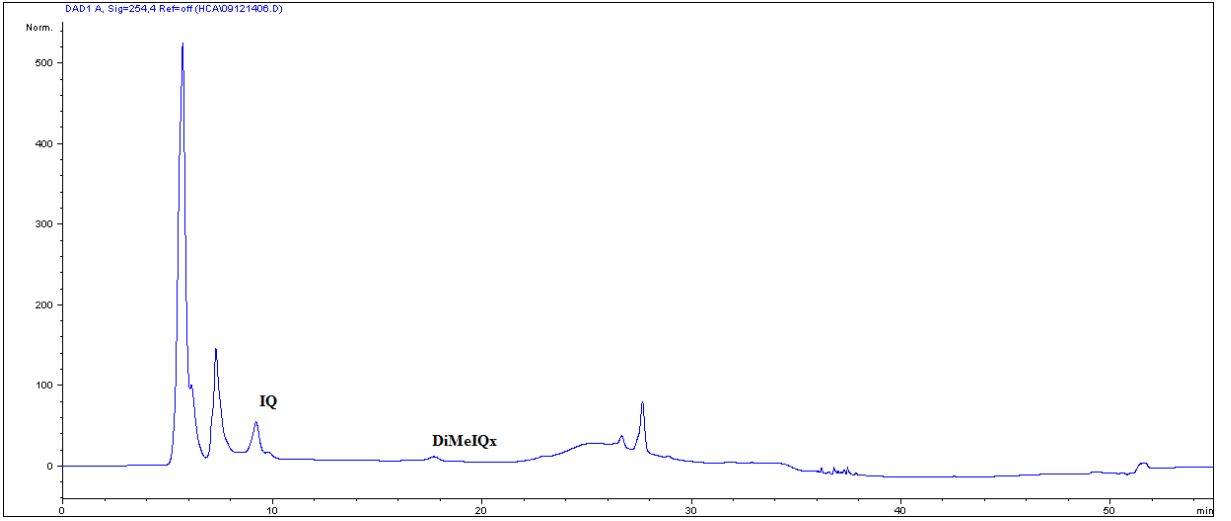
Az-orta-çok pişmiş örnek 3'e ait kromatogram görünüşleri aşağıda verilen Şekil 4.13, 4.14, 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.13. DAD dedektörde az pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı

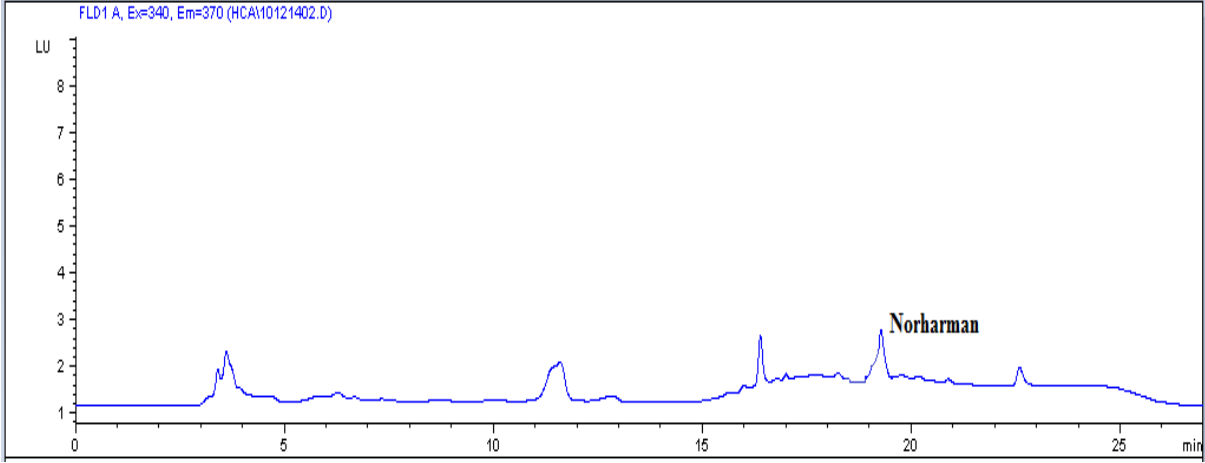


Şekil 4.14. DAD dedektörde orta pişmiş Örnek 3'e ait HPLC kromatogramı

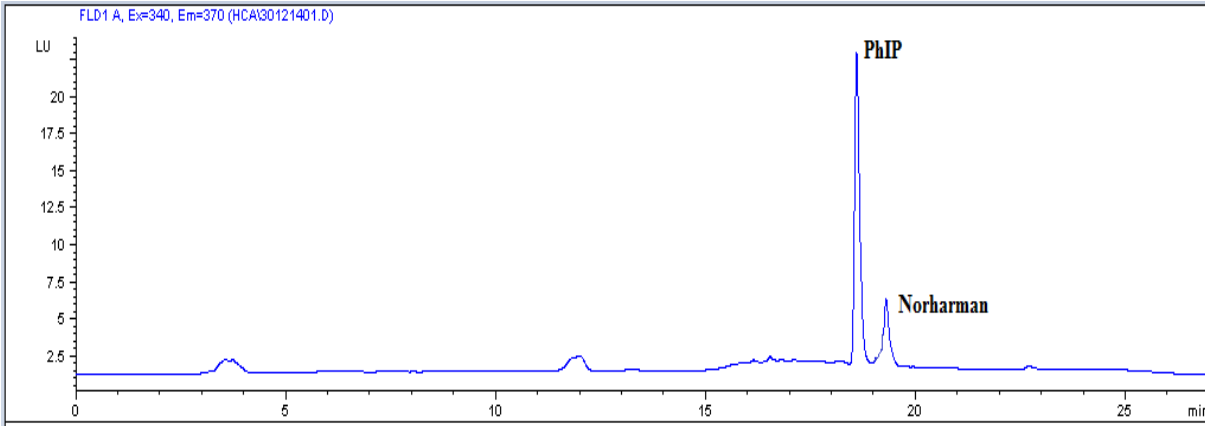


Şekil 4.15. DAD dedektörde çok pişmiş Örnek 3'e ait HPLC kromatogramı

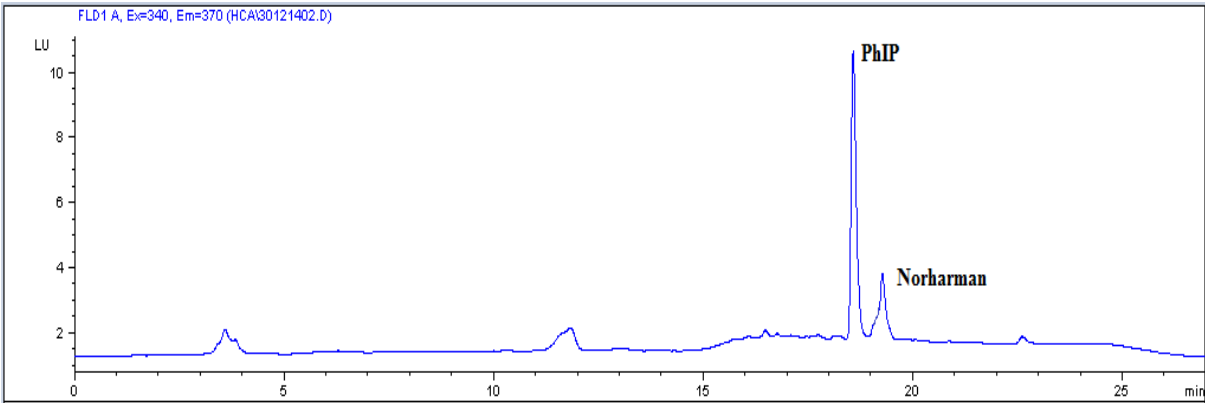
Az pişmiş sucuk örneklerinde Floresans dedektörde sadece PhIP belirlenmiştir. Şekil 4.16'da örnek 3'e ait kromatogram görünümü verilmiştir. Şekil 4.17 ve 4.18'de örnek 10 için PhIP ve norharman kromatogramları verilmiştir.



Şekil 4.16. Floresans dedektörde az pişmiş örnek 3'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.17. Floresans dedektörde orta pişmiş örnek 10'a ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.18. Floresans dedektörde çok pişmiş örnek 10'a ait HPLC kromatogramı

4.2. Sucuk Örneklerinin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Piştirme sırasında Protek 506 Digital Multimetre ile sucukların merkez sıcaklığı ölçülmüştür. Az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri belirlenen saniye parametrelerinde pişirilmiştir. Bu süreler ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Pişirilen sucuk örneklerinin merkez sıcaklığı Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin merkez sıcaklıkları

| | Az pişmiş (90 saniye) | Orta pişmiş (180 saniye) | Çok pişmiş (300 saniye) |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Merkez sıcaklığı (°C) | 37 | 42 | 47 |

4.2.1. Çiğ sucuk örneklerinin analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Piyasada bulunan 10 farklı firmaya ait çiğ sucuk (dana eti) örneklerinde pH analizi, nem analizi, kül analizi, yağ tayini ve protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Çiğ sucuk örneklerinde yapılan analizlerin sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çiğ sucuk örneklerinin kimyasal kompozisyonu ve pH değeri

| Örnek | pH analizi | Nem analizi (%, w/w) | Kül analizi (%, w/w) | Yağ tayini (%, w/w) | Protein tayini (%, w/w) |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Örnek 1 | 5,41 ^b ±0,00 | 33,10 ^g ±0,15 | 3,48 ^a ±0,04 | 44,56 ^a ±0,44 | 17,44 ^c ±0,13 |
| Örnek 2 | 5,29 ^c ±0,03 | 39,31 ^e ±0,84 | 3,22 ^b ±0,00 | 33,39 ^f ±0,11 | 21,17 ^a ±0,33 |
| Örnek 3 | 5,47 ^a ±0,01 | 52,50 ^a ±0,56 | 2,92 ^c ±0,00 | 22,73 ^h ±0,02 | 17,54 ^c ±0,58 |
| Örnek 4 | 5,01 ^e ±0,01 | 42,87 ^c ±0,58 | 2,27 ^f ±0,03 | 37,66 ^d ±0,35 | 17,71 ^c ±0,41 |
| Örnek 5 | 5,30 ^c ±0,01 | 35,82 ^f ±0,96 | 3,28 ^b ±0,06 | 41,83 ^b ±0,20 | 16,44 ^d ±0,54 |
| Örnek 6 | 5,11 ^d ±0,01 | 39,19 ^e ±0,52 | 2,24 ^f ±0,01 | 35,57 ^e ±0,35 | 15,17 ^e ±0,01 |
| Örnek 7 | 5,45 ^{ab} ±0,01 | 38,56 ^e ±0,13 | 3,24 ^b ±0,01 | 38,50 ^c ±0,67 | 19,80 ^b ±0,25 |
| Örnek 8 | 5,01 ^e ±0,04 | 40,99 ^d ±0,21 | 2,65 ^e ±0,026 | 34,88 ^e ±0,18 | 16,54 ^d ±0,54 |
| Örnek 9 | 4,87 ^f ±0,03 | 48,28 ^b ±0,39 | 2,69 ^e ±0,04 | 32,13 ^g ±0,00 | 15,98 ^{de} ±0,11 |
| Örnek10 | 5,44 ^{ab} ±0,04 | 40,55 ^d ±0,59 | 2,85 ^d ±0,02 | 41,89 ^b ±0,01 | 20,15 ^b ±0,35 |

Piştirme işlemleri 2 tekrar, analizler 3’er paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

^aDuncan testi sonucuna göre aynı sütündeki farklı harfler farklı grupları ifade etmektedir (P<0,05).

4.2.1.1. pH analizi

Çiğ sucuk örneklerinde yapılan pH analiz sonucunda; sucukların pH değerleri 4,87 ile 5,47 arasında değişmektedir. Çiğ sucuk örneklerin ortalama pH değeri 5,23'dir.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin pH sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$). Duncan testi sonucunda, 3 numaralı örneğin pH'sı diğer örneklerin pH değerine göre en büyük, 9 numaralı örneğin pH ise en küçük olarak saptanmıştır ($P<0,05$).

Sadece sucukların pH'sı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %99 olasılıkla korelasyon bulunmuştur. Az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri ile çiğ sucuk örneklerinde yapılan kül, nem, protein, yağ, çözünen protein sonuçları arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon bulunamamıştır.

Yapılan bir çalışmaya göre farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen köftelerde heterosiklik aminlerin oluşumunun sınırlandırılmasında optimum tuz, askorbik asit ve yağ kullanım seviyeleri yanıt yüzey yöntemiyle belirlenmiştir. Köfte örneklerinin pH sonuçları 5,81 ile 6,11 arasında bulunmuştur. Köfte örneklerinin pH ölçümleri sonrasında yapılan yanıt yüzey analizine göre; köfte örneklerine ilave edilen askorbik asit ve yağ ile uygulanan ısıl işlem süresinin köfte örneklerinin pH değeri üzerindeki lineer etkisi önemli ($P<0,01$) bulunmuştur. Köfte örneklerine ilave edilen askorbik asit ve yağ ile uygulanan ısıl işlem süresinin etkisi azalan yöndedir. Köfte örneklerine ilave edilen tuz ve yağın interaksiyonel etkileri köfte örneklerinin pH değeri açısından önemli ($P<0,01$) bulunmuştur. Köfte örneklerine ilave edilen tuz ve yağın interaksiyonel etkisi artan yöndedir. Aynı zamanda köfte örneklerine ilave edilen askorbik asit ve sıcaklığın interaksiyonel etkileri de köfte örneklerinin pH değeri açısından önemli ($P<0,05$) bulunmuştur. Köfte örneklerine ilave edilen askorbik asit ve sıcaklığın interaksiyonel etkisi ise azalan yöndedir. Köfte örneklerine ilave edilen tuz, askorbik asit ve yağ ile uygulanan sıcaklığın kuadratik etkileri köfte örneklerinin pH değeri açısından önemlidir ($P<0,01$). Köfte örneklerine ilave edilen tuz, askorbik asit ve yağ ile uygulanan sıcaklığın kuadratik etkileri azalan yöndedir (Dündar, 2011).

Literatürde sucuk örneklerinin pH değerlerinin 4,87 ile 5,47 arasında olduğu ve örneklerin pH sonuçlarının bu sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne göre fermente sucukta en yüksek pH 5,4 olmalıdır, sonuçlar standart sapmaları da dikkate alındığında tebliğe uygundur.

4.2.1.2. Nem analizi (% w/w)

Çiğ sucuk örneklerinin nem içeriklerinin bulunabilmesi için yapılan analiz sonuçlarında; sucukların nem içeriği %33,10 ile %52,50 arasında değişmektedir. Çiğ sucuk örneklerin ortalama nem miktarı % 41,12'dir. Anon. (2002)'ye göre nem miktarı 5 örnekte uygun bulunmuştur. Diğer 5 örnekte yüksek bulunmuştur. Bu farklılığında sucuğun matriksinden ve kimyasal bileşiminden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Bilge (2012)'nin yaptığı bir çalışmada sucuk örneklerinde üretim süresince 20-22°C'de nem miktarları belirlenmiştir. 20-22°C'de üretilen sucuklarda kontrol grubunda nem miktarı %57,87, starterli gruplarda (S1, S2, S3) sırasıyla %59,33, %58,51 ve %59,21 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile kıyaslama yapılacak olursa sonuçların uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin nem sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).

Nem analizi yapılan sucuk örneklerinde Duncan testi de uygulanmıştır. En yüksek nem içeriği 3 numaralı örnekte bulunurken, en düşük nem içeriği 1 numaralı örnekte bulunmaktadır.

4.2.1.3. Kül analizi (% w/w)

Çiğ sucuk örneklerinin kül oranının bulunabilmesi için yapılan analiz sonuçlarında; sucukların kül oranı %2,24 ile %3,48 arasında değişmektedir. Çiğ sucuk örneklerinin ortalama kül miktarı %2,88'dir.

Bilge (2012)'nin yaptığı bir çalışmada sucuk örneklerinde üretim süresince 20-22°C'de kül miktarlarında meydana gelen değişimler belirlenmiştir. 20-22°C'de üretilen sucuklarda kontrol grubunda kül miktarı %2,58, starterli gruplarda (S1, S2, S3) sırasıyla

%2,73, %2,37 ve %2,31 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre sucuk örneklerinin kül içeriğinin literatür ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Anon. (2001)'e göre fermente sucuklarda kül miktarı %2 –%5 arasında olmalıdır. Buna göre genel olarak bakıldığında örneklerin %2,24 ile %3,48 arasında kül içerdiği Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin kül içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$).

Kül analizi yapılan sucuk örneklerinde Duncan testi de uygulanmıştır. En fazla kül içeren örnek 1 numaralı örnek iken, en az kül içeren örnek 6 numaralı örnektir.

4.2.1.4. Yağ tayini (% , w/w)

Çiğ sucuk örneklerinde yapılan yağ analizi sonucunda; sucukların yağ oranları %22,73 ile %44,56 arasında değişmektedir. Sucuk örneklerinin yağ miktarlarının ortalaması %36,31 olarak bulunmuştur.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin yağ sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$).

Yağ analizi yapılan sucuk örneklerinde Duncan testi de uygulanmıştır.

20-22°C'de üretilen sucuklarda üretimin başında yağ miktarı ortalama %22,26, 9. günde ise kontrol grubunda %34,38, starterli gruplarda (S1, S2, S3) sırasıyla %33,22, %33,33 ve %33,33 olmuştur. 24-26°C'de üretilen sucuklarda 0. günde ortalama %22,63, 9. günde kontrol grubunda %35,50, starterli gruplarda (S1, S2, S3) sırasıyla %35,16, %35,75 ve %33,88 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2.1'de verilen sucuğun kimyasal bileşimine göre sucuğun yağ miktarı en çok %35 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ise sucuk örneklerinin yağ miktarı en çok %44,56 bulunmuştur. Bu çalışma literatür ile kıyaslandığında 5 örneğin yağ miktarları yüksek

bulunmuştur. Diğer 5 örnek ise literatür ile uyumludur. Bu farklılığın sebebi olarak da üretici firmaların kullandığı yağ oranının standartlara uygun olmayan düzeyde olduğu düşünülmektedir.

4.2.1.5. Protein tayini (% w/w)

Çiğ sucuk örneklerinde yapılan protein analiz sonucunda; sucukların protein içerikleri %15,17 ile %21,17 arasında değişmektedir. Sucuk örneklerinin protein miktarlarının ortalaması %17,79 olarak bulunmuştur. Anon. (2002) sucuk standardına göre I.sınıf sucuklardaki protein oranı en az % 22, II. sınıf ve III. sınıf sucuklardaki protein oranları ise en az % 20 olmalıdır. Buna göre piyasadan toplanan sucuk örneklerinin %80'inin et kalitesinin düşük olduğunu söyleyebiliriz.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin protein içerikleri arasında anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$).

Protein analizi yapılan sucuk örneklerinde Duncan testi de uygulanmıştır. En fazla protein içeren örnek 2 numaralı örnek iken, en az protein içeren örnek 6 numaralı örnektir.

Bilge (2012)'nin yaptığı bir çalışmada 20-22°C'de üretilen sucuklarda üretimin başında belirlenen protein miktarları ortalama %15,18; üretimin sonunda starterli gruplarda S1, S2 ve S3 gruplarında sırasıyla %20,59, %20,15, %21,08 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile kıyaslanacak olursa sonuçların protein miktarlarının düşük miktarlarda olduğu söylenebilir.

Çizelge 2.1'de verilen sucuğun kimyasal bileşimine göre sucuğun protein miktarı en az %22 verilmiştir. Yapılan protein analiz sonuçlarında en çok %21,17 bulunmuştur. Bu farklılığın sebebi de üretici firmaların sucuğu üretirken olması gereken değerden daha az et kullandığı yönünde açıklanabilir.

4.2.2. Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Piyasada bulunan 10 farklı firmaya ait pişmiş sucuk (dana eti) örneklerinde çözünür protein analizi ve HCA analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. Çözünür protein analizi sonuçları

Çizelge 4.3'de verilen analiz sonuçlarına göre; az pişmiş sucuk örneklerinde çözünür protein içeriği 19,00 mg/100 g ile 57,60 mg/100 g arasında değişmektedir. Orta pişmiş sucuk örneklerinde çözünür protein içeriği 23,90 mg/100 g ile 41,80 mg/100 g arasında değişmektedir. Çok pişmiş sucuk örneklerinde çözünür protein içeriği 24,40 mg/100 g ile 53,20 mg/100 g arasında değişmektedir.

Sucuk örneklerinde az pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$). En fazla çözünür protein içeren örnek 7 numaralı örnek iken, en az çözünür protein içeren örnek 8 numaralı örnektir.

Sucuk örneklerinde orta pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$). En fazla çözünür protein içeren örnek 3 numaralı örnek iken, en az çözünür protein içeren örnek 8 numaralı örnektir.

Sucuk örneklerinde çok pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$). En fazla çözünür protein içeren örnek 10 numaralı örnek iken, en az çözünür protein içeren örnek 9 numaralı örnektir.

Az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin kendi içinde Duncan testi uygulanmıştır. Çizelge 4.3'de pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarları ve Duncan testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Pişmiş sucuklarda yapılan çözünür protein analiz sonuçlarının ortalaması (mg/100 g) ve standart sapmaları

| Çözünür protein analizi (mg/100 g) | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Örnek 1 | 33,90 ^d ±1,70 | 33,80 ^{cd} ±1,50 | 37,00 ^c ±0,60 |
| Örnek 2 | 53,61 ^b ±1,81 | 32,92 ^d ±1,33 | 40,31 ^b ±0,60 |
| Örnek 3 | 24,60 ^f ±0,80 | 41,00 ^a ±1,90 | 33,10 ^d ±1,90 |
| Örnek 4 | 31,63 ^e ±2,14 | 34,00 ^{cd} ±2,10 | 37,12 ^c ±0,70 |
| Örnek 5 | 53,10 ^b ±1,00 | 41,80 ^a ±1,50 | 26,60 ^{ef} ±0,60 |
| Örnek 6 | 37,40 ^c ±0,60 | 24,50 ^f ±3,44 | 51,90 ^a ±3,30 |
| Örnek 7 | 57,60 ^a ±1,40 | 38,30 ^b ±0,40 | 29,50 ^e ±0,80 |
| Örnek 8 | 19,00 ^g ±1,30 | 23,90 ^f ±1,70 | 27,90 ^e ±0,90 |
| Örnek 9 | 36,34 ^c ± 3,92 | 29,00 ^e ±0,60 | 24,40 ^f ±2,50 |
| Örnek 10 | 22,90 ^f ±1,50 | 36,40 ^{bc} ±1,74 | 53,20 ^a ±1,13 |

^aDuncan testi sonucuna göre aynı sütündeki farklı harfler farklı grupları ifade etmektedir (P<0,05).

Choi et al. (2010)'un yaptığı bir çalışmada kurutulmuş domuz ürünlerinde çözünür protein içeriği belirlenmiştir. Az-orta-yüksek protein içerikli kurutulmuş domuz ürünlerinde sırasıyla 204,92 ppm, 184,43 ppm, 142,33 ppm olarak belirlenmiştir.

Canlı (2012)'nin yaptığı bir çalışmada et köfte örneğinin çözünür protein içeriği 1,28 ppm ile 7,94 pmm arasında bulunmuştur. Et döner örneğinin protein içeriği 2,85 ppm ile 8,33 ppm arasında bulunmuştur. Tavuk köftesi örneğinin protein içeriği 2,95 ppm ile 4,95 ppm arasında bulunmuştur. Tavuk döner örneğinin protein içeriği 3,37 ppm ile 4,36 ppm arasında bulunmuştur. Bizim sonuçlarımız literatüre göre daha yüksek bulunmuştur, bu da ürünün yapısının kurutulmuş ürün olmasından kaynaklanmaktadır.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri arasında çözünür protein içeriği açısından anlamlı bir fark yoktur (P>0,05).

Duncan testine göre çözümler protein içeriği az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Ancak sayısal değerlere bakıldığında, az pişmiş sucuk örneğinin çözümler protein içeriği en fazla bulunmuştur.

[Duncan testi sonucu: 1^a: az pişmiş sucuk örneği, 2^a: orta pişmiş sucuk örneği, 3^a: çok pişmiş sucuk örneği].

4.2.3. Pişmiş sucuk örneklerinin HCA sonuçları

4.2.3.1. Sucuk örneklerinin IQ miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinin IQ miktarları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Pişmiş sucuk örneklerinin IQ miktarları (ng/g)

| Örnek kodları | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|---------------|-----------|-------------|------------|
| Örnek 1 | B | B | B |
| Örnek 2 | B | B | B |
| Örnek 3 | 1,77±0,23 | 0,84 ±0,40 | 3,84 ±0,59 |
| Örnek 4 | B | B | B |
| Örnek 5 | B | B | B |
| Örnek 6 | B | B | B |
| Örnek 7 | B | B | B |
| Örnek 8 | B | B | B |
| Örnek 9 | B | B | B |
| Örnek 10 | B | B | B |

*B=Belirlenemedi.

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analizinin sonucuna göre; az pişmiş sucuk örneklerinde IQ miktarı sadece örnek 3’te 1,77 ng/g olarak bulunmuştur. Orta pişmiş örnek

3'te 0,84 ng/g olarak bulunmuştur. Çok pişmiş örnek 3'te ise 3,84 ng/g olarak bulunmuştur. Diğer örneklerde IQ bileşiği belirlenememiştir. Aşağıda verilen literatür sonuçları, tez çalışmamızda bulduğumuz IQ miktarları ile benzer sonuçlar göstermektedir. Aynı zamanda sucuk örneklerinin 9'unda IQ belirlenememiştir. Bu farklılığın sucuğun matrisinden ve kimyasal bileşiminden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Sıcaklık derecesi ile HCA oluşumu arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada kreatin, glukoz ve aminoasitlerden oluşan bir model sistemin 0-120 dk arasında 150-225°C'ye ısıtılmasıyla IQ bileşiğinin oluşmadığı bildirilmiştir (Skog et al., 1998).

Balogh et al. (2000) yaptığı bir çalışmada, 175 °C'de 12 ve 20 dakika pişirdikleri köfte örneklerinde sırasıyla 0,7 ve 1,3 ng/g IQ oluşumu tespit ederken; 200 °C'de aynı sürelerde yapılan pişirme işlemi sonucunda köfte örneklerinde ortaya çıkan IQ miktarı sırasıyla 1,7 ve 4,4 ng/g olarak belirlenmiştir.

Britt et al. (1998) yaptığı bir çalışmada %15 yağlı hamburgerlerde 170 °C'de 1,1 ng/g, 200°C'de 5,46 ng/g IQ belirlerken 225°C'de tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Öz and Kaya (2011) karabiber ilave ederek elektrikli ızgarada pişirdikleri köftelerde kontrol örneğindeki IQ miktarını 175 °C'de 1,40 ng/g, 200 °C'de 5,46 ng/g bulurken karabiber ilaveli örneklerde 0,93 ng/g ve 4,85 ng/g olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Doğal özütlerin HCA oluşumuna etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada dana etleri 200 °C/20 dk'da pişirilmiştir. Kontrol örneğindeki IQ miktarı 3,22 ng/g olarak bulunurken %0,5 üzüm çekirdeği özütü ilaveli örnekte 1,60 ng/g, %1 üzüm çekirdeği ilaveli örnekte ise 1,15 ng/g bulunmuştur (Ahn and Grün, 2005).

Bu çalışmanın sonuçları genel olarak literatürdeki sonuçlar ile uyum göstermektedir, literatürde sucukta yapılan HCA ile ilgili bir çalışma olmadığı için kıyaslama yapılamamıştır.

4.2.3.2. Sucuk örneklerinin MeIQx miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analizinin sonucuna göre; tüm sucuk örneklerinde MeIQx belirlenememiştir.

Sıcaklık derecesi ile HCA oluşumu arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada kreatin, glukoz ve aminoasitlerden oluşan bir model sistemin 0-120 dk arasında 150-225°C'ye ısıtılmasıyla MeIQx'in oluşmadığı bildirilmiştir (Skog et al., 1998).

Pişirme metotlarının (tavada kızartma, fırında pişirme ve ızgara/barbekü) HCA oluşumu üzerine etkilerini belirlemek için yapılan bir araştırmada, çok iyi derecede ızgara/barbekü yapılan hamburgerlerde 4,6 ng/g MeIQx, çok iyi derecede tavada kızartılmış biftekte 8,2 ng/g MeIQx tespit edilmiştir. Tavada kızartma ve ızgara/barbekü metotları uygulanacak örneklerde fazla miktarda MeIQx oluşumu görülürken fırında pişirme metodu uygulanan örneklerin muhtemelen aynı iç sıcaklığa daha uzun zamanda ulaşması nedeniyle bu bileşiklerin daha az miktarda oluştuğu belirtilmiştir (Sinha et al., 1998).

Johansson et al. (1995)'in tarafından yapılan bir çalışmada 165–200 °C'de 8 dakika pişirilen köfte örneklerinin tava kalıntılarında MeIQx tespit edilememiştir.

Busquets et al. (2004) 175–200°C'de 11,2 dakika pişirdikleri hamburger örneklerinde MeIQ tespit edememişlerdir.

Öz (2006)'nın yaptığı çalışmada 225 °C'de defne katkılı örneklerde 0,07 ng/g MeIQx tespit etmiştir.

Ahn and Grün (2005)'in yaptığı bir çalışmada 200 °C/20 dk'da pişirilen dana eti köftelerinde kontrol grubunda 22,65 ng/g MeIQx bulurken %0,5 üzüm çekirdeği özütü ilaveli edilen örneklerde 8,62 ng/g, %1 üzüm çekirdeği özütü ilave edilen örneklerde ise 6,90 ng/g tespit etmiştir.

Zimmerli et al. (2001)'in yaptığı bir çalışmada İsviçre'de toplam 86 farklı et ve balık örneğini analiz etmişler ve bu ürünlerde 200 °C'de iyi derecede pişirilen bifteğin, 1.69 ng/g MeIQx içerdiğini tespit etmişlerdir.

Cheng et al. (2007)'nin yaptığı bir çalışmada % 0,1 oranında üzüm çekirdeği ilave edilen köftelerin 210 °C/6 dk pişirilmesi neticesinde MeIQx miktarında %67 oranında azalma olduğunu belirtmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları genel olarak literatürdeki sonuçlar ile uyum göstermektedir, literatürde sucukta yapılan HCA ile ilgili bir çalışma olmadığı için kıyaslama yapılamamıştır.

4.2.3.3. Sucuk örneklerinin 4,8-DiMeIQx miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinin 4,8-DiMeIQx miktarları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Pişmiş sucuk örneklerinin 4,8-DiMeIQx miktarları (ng/g)

| Örnek kodları | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|----------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Örnek 1 | B | B | B |
| Örnek 2 | B | B | B |
| Örnek 3 | 3,57±0,56 | 5,98 ±0,35 | 2,91 ±0,76 |
| Örnek 4 | B | B | B |
| Örnek 5 | B | B | B |
| Örnek 6 | B | B | B |
| Örnek 7 | B | B | B |
| Örnek 8 | B | B | B |
| Örnek 9 | B | B | B |
| Örnek 10 | B | B | B |

*B=Belirlenemedi.

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analiz sonucuna göre; sadece örnek 3'de sırasıyla az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinde sırasıyla 3,57 5,98 ve 2,91 ng/g olarak bulunmuştur. Diğer 9 örnek de 4,8-DiMeIQx belirlenememiştir. Aşağıdaki çalışmalara göre değerlendirecek olursak 3 nolu sucuk örneğinde bulunan 4,8-DiMeIQx miktarının fazla olduğu görülmektedir. Ancak bu farklılık çok göze çaracak şekilde olmamasının yanısıra diğer 9 örnekte çıkmamış olması da literatür sonuçları ile uyumludur.

Turesky ve ark. (1988)'in yaptığı bir çalışmada ise 275 °C'de 5 ve 10 dakika pişirdikleri köfte örneklerinde 4,8-DiMeIQx oluşumu tespit edememişken; pişirme süresinin 15 dakikaya çıkmasıyla köfte örneklerinde oluşan 4,8-DiMeIQx miktarını 3,9 ng/g olarak belirlemişlerdir.

Öz and Kaya (2011)'in yaptığı bir başka çalışmada karabiber ilave edilerek elektrikli ızgarada pişirilen köfte örnekleri incelenmiş ve kontrol örneğindeki 4,8-DiMeIQx miktarı 175°C ve 200 °C'de tespit edemezken 225 °C'de kontrolde 3,35 ng/g tespit edilmiş, karabiber ilave edilen örneklerde ise tüm sıcaklık değerlerinde tespit edilmemiştir.

Ahn and Grün (2005)'in yaptığı bir çalışmada 200 °C/20 dk'da pişirilen dana eti köftelerinde kontrol grubunda 1,74 ng/g 4,8-DiMeIQx bulurken % 0,5 üzüm çekirdeği özütü ilaveli örnekte 1,50 ng/g, %1 üzüm çekirdeği özütü ilaveli örnekte ise tespit edilememiştir.

Wong et al. (2005)'in yaptığı bir çalışmada tüketime hazır 25 taze et ürününün 10 tanesinde (% 40) 4,8-DiMeIQx bulmuşlardır. Tavada kızartılan balık etinin 0,21 ng/g, tavuk etinin 0,48 ng/g, derin yağda kızartılan tavuk etinin 0,23 ng/g, ızgara/rostto yapılan domuz etinin 0,33 ng/g, tavada kızartılan domuz etinin ise 0,28 ng/g 4,8-DiMeIQx içerirken ördek ve sığır etinde 4,8-DiMeIQx tespit edememişlerdir.

Zimmerli et al. (2001), İsviçre de toplam 86 farklı et ve balık örneğini analiz etmişler ve bu ürünlerde 200 °C'de iyi derecede pişirilen bifteğin 0,58 ng/g 4,8-DiMeIQx içerdiğini tespit etmişlerdir.

4.2.3.4. Sucuk örneklerinin PhIP miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinin PhIP miktarları Çizelge 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Pişmiş sucuk örneklerinin PhIP miktarları (ng/g)

| Örnek kodları | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|---------------|-----------|-------------|------------|
| Örnek 1 | B | B | B |
| Örnek 2 | B | B | B |
| Örnek 3 | B | B | B |
| Örnek 4 | B | 9,75±0,98 | B |
| Örnek 5 | B | B | B |
| Örnek 6 | B | B | B |
| Örnek 7 | B | B | B |
| Örnek 8 | B | B | B |
| Örnek 9 | B | B | B |
| Örnek 10 | B | 6,02 ±0,71 | 8,53 ±0,28 |

*B=Belirlenemedi.

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analizinin sonucuna göre; PhIP miktarı orta pişmiş örnek 4'te 9,75 ng/g ve sırasıyla orta pişmiş, çok pişmiş örnek 10'da 6,02 ng/g, 8,53 ng/g olarak belirlenmiştir. Diğer sucuk örneklerinde PhIP miktarı belirlenememiştir.

Thiébaud et al. (1995)'in yaptığı bir çalışmada kızartılan etlerde 198 °C'de tespit edilen PhIP miktarının 4,9 ng/g olduğunu belirtmişlerdir.

Shin et al. (2003)'ün yaptığı bir çalışmada 225 °C'de 20 dakika pişirdikleri köfte örneklerinde 16,817 ng/g PhIP tespit etmişlerdir.

Sinha et al. (1998)'ların yaptığı bir çalışmada pişirme metotlarının (tavada kızartma, fırında pişirme ve ızgara/barbekü) HCA oluşumu üzerine etkilerini belirlemek için yapılan bir araştırmada, çok iyi derecede ızgara/barbekü yapılan hamburgerlerde 16,8 ng/g PhIP tespit edilmiştir. PhIP miktarı ızgara/barbekü yapılmış biftekte maksimum 30,0 ng/g seviyesinde bulunmuştur. Tavada kızartma ve ızgara/barbekü metotları fazla miktarda PhIP üretirken fırında pişirme metodu muhtemelen aynı iç sıcaklığa daha uzun zamanda ulaşması nedeniyle bu bileşiklerin her ikisinin de az miktarda oluştuğu belirtilmiştir.

Zimmerli et al. (2001) İsviçre'de toplam 86 farklı et ve balık örneğini analiz etmişler ve bu ürünlerde farklı seviyelerde HCA özellikle PhIP bileşiği olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek miktarı (13,1 ng/g PhIP) kızartılmış domuz bifteğinde tespit etmişlerdir. Izgara edilmiş kuzu bifteğinde 9,7 ng/g, kızartılmış sığır yahnisinde 6 ng/g PhIP belirlemişlerdir. 200°C'de iyi derecede pişirilen bifteğin IQ ve MeIQx içermediğini, ancak 1,55 ng/g PhIP içerdiğini tespit etmişlerdir.

Öz and Kaya (2011)'in yaptığı bir çalışmada karabiber ilave ederek elektrikli ızgarada pişirdikleri köftelerde kontrol örneğindeki PhIP miktarını 200 °C'de 31,8 ng/g olarak bulurken karabiber ilaveli örnekte tespit edilememiş ve %100 azalttığı belirtilmiştir.

Ahn and Grün (2005)'nin yaptığı bir çalışmada 200 °C/20 dk'da pişirilen dana eti köftelerinde kontrol grubunda 12,13 ng/g PhIP bulurken %0,5 üzüm çekirdeği özütü ilavelide 5,93 ng/g, %1 ilavelide ise 4,40 ng/g tespit etmiştir.

4.2.3.5. Sucuk örneklerinin Harman miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analizinin sonucuna göre; sucuk örneklerinin hiçbirinde harman belirlenememiştir.

Yapılan bir çalışmada 200 °C/20 dk'da pişirilen dana eti köftelerinin kontrol grubunda 10,88 ng/g harman bulurken %0,5 üzüm çekirdeği özütü ilavelide 78,31 ng/g, %1 ilavelide ise 109,14 ng/g tespit etmiştir. Genelde artan özüt oranı diğer HCA'lar üzerinde önemli bir

azalışa neden olurken harmanda tersine artışa neden olmuştur. Bunu da pik girişimi veya ekstraksiyon hatası olabileceği şeklinde açıklamıştır (Ahn and Grün, 2005).

Yapılan bir çalışmada yağda kızartılmış tavuk göğsünde 0,5 ng/g oranında harman ve norharman bulunmuştur. Tavada kızartılmış olan tavuk göğsünde 10 ng/g'ın altında harman ve norharman saptanmıştır. Tavada kızartılan tavuk ciğerinde ise hiç HCA'ya rastlanmamıştır (Solyakov and Skog, 2002).

4.2.3.6. Sucuk örneklerinin Norharman miktarları

Pişmiş sucuk örneklerinin norharman miktarları aşağıdaki Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Pişmiş sucuk örneklerinin Norharman miktarları (ng/g)

| Örnek kodları | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|----------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Örnek 1 | 9,01 ±0,20 | B | 10,44±0,11 |
| Örnek 2 | B | B | 9,62 ±0,30 |
| Örnek 3 | 9,44 ±0,02 | 9,02 ±3,02 | 10,02±0,00 |
| Örnek 4 | B | B | B |
| Örnek 5 | B | B | B |
| Örnek 6 | 6,21 ±0,31 | 6,01 ±0,30 | B |
| Örnek 7 | B | 6,11 ±0,51 | 10,54±1,41 |
| Örnek 8 | B | B | B |
| Örnek 9 | B | B | B |
| Örnek 10 | B | 9,31 ±0,30 | 6,01 ±1,01 |

*B=Belirlenemedi.

Pişmiş sucuk örneklerinde yapılan HCA analizinin sonucuna göre; az pişmiş sucuk örneklerinde Norharman içeriği 6,21 ile 9,44 ng/g arasında değişmektedir. Orta pişmiş sucuk örneklerinde 6,01 ile 9,31 ng/g arasında değişmektedir. Çok pişmiş sucuk örneklerinde ise 6,01 ile 10,54 ng/g arasında değişmektedir. Örnek 4,5,8,9'da ise üç koşulda da norharman belirlenememiştir. Sucukta bulunan norharman miktarı genel olarak yapılan çalışmalara göre yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni ise matriksinden kaynaklı olabilmektedir. Aynı zamanda diğer tüm örneklerde belirlenemediği için yüksek miktarlardan söz edemeyiz.

Yapılan bir çalışmada pişirme yöntemine göre tavada, yağda, mangalda, fırında ördek göğüs eti pişirilmiştir. Norharman miktarı tavada pişirilen ördek göğüs etlerinde 6,15 ng/g, yağda pişirilen ördek göğsü etinde 3,77 ng/g, mangalda pişirilenlerde 4,95 ng/g, fırında pişirilenlerde ise 6,12 ng/g olarak tespit edilmiştir (Liao et al., 2010).

Ahn and Grün (2005)'nin yaptığı çalışmada 200 °C/20 dk'da pişirilen dana köftelerinde kontrol grubunda 5,55 ng/g norharman bulunurken %0,5 üzüm çekirdeği özütü ilave edilen örneklerde 5,38 ng/g, %1 üzüm çekirdeği özütü ilave edilen örneklerde 5,16 ng/g tespit edilmiştir.

Khan et al. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada sığır karaciğeri ve dili ile kuzu böbreği gibi çeşitli sakatatlarda HCA oluşumu üzerine yaptıkları çalışmada; bu tarz ürünlerde özellikle harman, norharman oluşumunun 2 ng/g tespit edilmiştir. 200 °C'nin üzerinde gerçekleştirilen ısı işlemler sonucunda belirtilen seviyelerde HCA oluşumu; et türleri içerisinde sakatatların HCA oluşumu açısından en az etkilenen gruplardan biri olduğunu ortaya koymuştur.

4.2.3.7. Sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları

Az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 0,65 ng/g ile 14,84 ng/g arasında değişmektedir. Az pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 3,69 ng/g'dır.

Orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 1,52 ng/g ile 16,10 ng/g arasında değişmektedir. Az pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 5,66 ng/g'dır.

Çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 1,83 ng/g ile 17,89 ng/g arasında değişmektedir. Çok pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 6,77 ng/g'dır.

Sucuk örneklerinde az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark var bulunmuştur ($P<0,05$).

Sucuk örneklerinde orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark var bulunmuştur ($P<0,05$).

Sucuk örneklerinde çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark var bulunmuştur ($P<0,05$).

Az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin kendi içinde Duncan testi uygulanmıştır. Çizelge 4.6'da pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı ve Duncan testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları (ng/g)

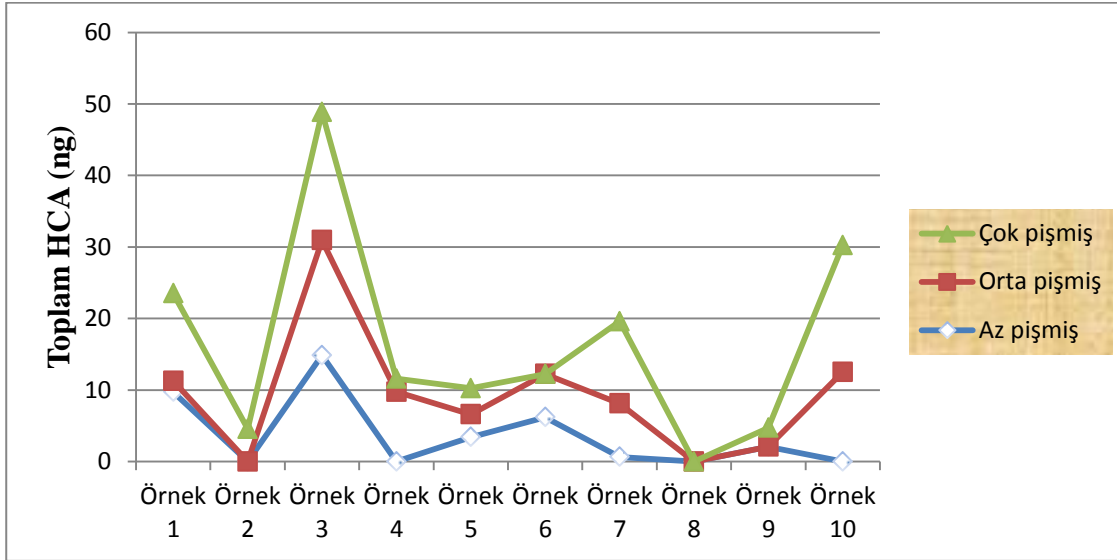
| Örnek kodları | Az pişmiş | Orta pişmiş | Çok pişmiş |
|---------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Örnek 1 | 9,74 ^b ±0,61 | 1,52 ^g ±0,34 | 12,23 ^b ±1,15 |
| Örnek 2 | B | B | 4,56 ^d ±0,27 |
| Örnek 3 | 14,84 ^a ±0,78 | 16,10 ^a ±0,69 | 17,89 ^a ±0,46 |
| Örnek 4 | B | 9,75 ^c ±0,98 | 1,83 ^g ±0,05 |
| Örnek 5 | 3,41 ^d ±0,01 | 3,197 ^f ±0,167 | 3,63 ^e ±0,03 |
| Örnek 6 | 6,21 ^c ±0,30 | 6,02 ^e ±0,26 | B |
| Örnek 7 | 0,65 ^f ±0,01 | 7,47 ^d ±0,44 | 11,47 ^c ±0,90 |
| Örnek 8 | B | B | B |
| Örnek 9 | 2,08 ^e ±0,13 | B | 2,63 ^f ±0,07 |
| Örnek 10 | B | 12,52 ^b ±1,73 | 17,71 ^a ±0,57 |

*B=Belirlenemedi.

Keşkekoğlu (2012)'ün yaptığı bir çalışmada dana eti köftelerinin yağda pişirilmesi durumunda kontrol grubunda 154,63 ng/g toplam HCA tespit edilirken, üzüm çekirdeği özütü ilaveli köftelerde %20 artış ile 182,65 ng/g, nar çekirdeği özütü ilaveli köftelerde ise %46 azalışla 83,23 ng/g toplam HCA tespit edilmiştir. Fırında pişirilen tavuk eti köftelerinde ise kontrol grubunda 88,36 ng/g, üzüm çekirdeği özütü ilavelilerde 54,83 ng/g, nar çekirdeği özütü ilavelilerde ise 154 ng/g toplam HCA oluştuğu tespit edilmiştir. Mangalda pişirilen kontrol grubu dana eti köftelerinde 345,98 ng/g, üzüm çekirdeği özütü ilaveli köftelerde 121,61 ng/g, nar çekirdeği özütü ilaveli köftelerde ise 209,57 ng/g toplam HCA tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmaya göre toplam HCA miktarının pişmiş sucuk örneklerinde düşük olduğunu görebiliyoruz. Bunun nedeni ise pişirme yönteminin mangalda ve fırında pişirme gibi çok yüksek sıcaklıklarda yapılmadığına bağlayabiliriz. Aynı zamanda sucuğun kimyasal bileşiminin et ve tavuğa göre farklı olması ve sucuğun üretiminde farklı bileşenlerin kullanılıyor olmasına (baharat, katkı maddeleri vb.) bağlayabiliriz.

Ayrıca Şekil 4.19'da toplam HCA içeriğinin piyasadan toplanan 10 sucuk örneğinde az-orta-çok pişmiş olacak şekilde grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Toplam HCA miktarının örneklere göre dağılımı

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri toplam HCA içeriği açısından aralarında anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).

Duncan testine göre çok pişmiş örneklerin toplam HCA içeriği ile az pişmiş örneklerin HCA içeriği arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Çok pişmiş örneğin toplam HCA içeriği en fazladır (Duncan testi sonucu: *3^a: çok pişmiş sucuk örneği, 2^{ab}: orta pişmiş sucuk örneği, 1^b: az pişmiş sucuk örneği).

Sucukların pH'sı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların kül miktarı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların nem miktarı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların protein miktarı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların yağ miktarı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Az pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarı ile az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların kül miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların nem miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların protein miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların yağ miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların pH miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Orta pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarı ile orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların kül miktarı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların nem miktarı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların protein miktarı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların yağ miktarı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Sucukların pH'sı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %99 olasılıkla korelasyon vardır.

Çok pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein miktarı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon yoktur.

Canlı (2012)'nin yaptığı bir çalışmada HCA analizinin yanı sıra et köfte örneklerinde nem ve çözünür protein analizleri de yapılmış ve bu parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon testi ile araştırılmıştır. İzmir' de üretim yapan 10 farklı yerden alınan et köfte numunelerinde % nem konsantrasyonu ile MeIQx konsantrasyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulmuştur ($P<0,01$). % nem konsantrasyonu ile Norharman konsantrasyonu arasında da pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulmuştur ($P<0,01$). % nem

konsantrasyonu ile PhIP konsantrasyonu arasında da pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulmuştur. ($P<0,01$). Çözünür protein konsantrasyonu ile MeIQx konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulamamıştır ($P>0,05$). Çözünür protein konsantrasyonu ile Norharman konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulamamıştır ($P>0,05$). Çözünür protein konsantrasyonu ile PhIP konsantrasyonu arasında da pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulamamıştır ($P<0,01$).

5.SONUÇ

Çalışmada az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinde gıdalarda en fazla oluşan HCA'lardan olan IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, norharman ve harman analizleri yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında HPLC cihazı ile DAD ve Floresans dedektörler kullanılmıştır. 10 farklı firmaya ait fermente sucuk örnekleri satın alınarak sucuk pişirme süresinin HCA oluşumuna etkisi ilk kez ortaya konulmuş ve piyasadan temin edilen sucuk örneklerinin HCA içeriği ilk kez belirlenmiştir. Bu amaçla güvenilir, tekrarlanabilir, geri kazanımı yüksek bir analiz yöntemi kullanılmıştır.

Bu çalışmada sucuk örneklerinde çiğ ve pişmiş örneklerde yapılan analizlerin sonuçları arasında istatistiksel olarak bir korelasyon olup olmadığı ve yine elde edilen tüm sonuçların arasında anlamlı bir fark olup olmadığı varyans analizi ve Duncan testi ile istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

Sadece sucukların pH'sı ile çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı arasında Pearson korelasyon testine göre %99 olasılıkla korelasyon bulunmuştur. Az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri ile çiğ sucuk örneklerinde yapılan kül, nem, protein, yağ, çözünen protein sonuçları arasında Pearson korelasyon testine göre %95 olasılıkla korelasyon bulunamamıştır.

Analiz edilen sucuk örneklerinin hiçbirinde MeIQx ve harman tespit edilmezken, örneklerin sadece birinde IQ ve DiMeIQx tespit edilmiştir. Örneklerin sadece ikisinde PhIP tespit edilmiştir. Örneklerde en fazla bulunan HCA norharmandır. Az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 0,65 ng/g ile 14,84 ng/g arasında değişmektedir. Az pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 3,69 ng/g'dır. Orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 3,19 ng/g ile 16,10 ng/g arasında değişmektedir. Az pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 5,66 ng/g'dır. Çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarı 1,83 ng/g ile 17,89 ng/g arasında değişmektedir. Çok pişmiş sucuk örneklerinin ortalaması ise 6,77 ng/g'dır.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin HCA içerikleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği, az pişmiş örneklerin toplam HCA içeriğinden fazla bulunmuştur. Bu sonuç literatür ile uyum göstermektedir.

Sucuk örneklerinde az pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Sucuk örneklerinde orta pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Sucuk örneklerinde çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre az-orta-çok pişmiş sucuk örneklerinin çözünür protein içeriği arasında anlamlı bir fark yoktur ($P>0,05$).

Duncan testine göre çözünür protein içeriği az-orta-çok pişmiş sucuk örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

Sayısal değer olarak bakıldığında az pişmiş sucuk örneğinin çözünür protein içeriği en fazla bulunmuştur.

Varyans analizi (ANOVA)'ne göre çiğ sucuk örneklerinin protein, kül, nem, yağ, pH miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Yapılan çalışmalarda, yüksek oranda antioksidan içeren baharatların, kızartılmış etteki birçok HCA miktarını azaltabileceği belirtilmiştir (Murkovic et al., 1998). Mutajenik aktivitenin azaltılmasına yönelik olarak gıdalara antioksidan, baharat, soya, triptofan, katkı maddeleri, lahana, soğan, şeker ve nişasta katılarak, indirgeme üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Çeşitli çalışmalarda Vitamin E, kiraz dokusu, çay polifenolik bileşikleri, sarımsak sülfür bileşikleri ve oligosakkaritler ile inulin gibi bazı gıda katkılarının, gıdalardaki HCA miktarının düzeyini azalttığı belirtilmektedir (Öz ve Kaya, 2007; Keşkekoğlu, 2012).

Yapılan çalışmalara bakıldığında baharat, antioksidan, sarımsak, şeker gibi gıda katkı maddelerinin HCA miktarını azaltılabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan fermente sucuk örnekleri içinde bulunan baharat, antioksidan, sarımsak, şeker gibi gıda katkı maddelerinin, HCA miktarının düşük olmasını etkileyen etkenler olabileceği düşünülmektedir.

İnsanların günlük HCA alım miktarları yaklaşık 2-25 ng/kg/gün olarak belirtilmektedir. Günlük HCA alım miktarı ile TD₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, günlük alım miktarının uzun dönemde tümör oluşumu için oldukça düşük değerlerde olduğu kabul edilebilmektedir (Keating and Bogen, 2004; Turesky and Marchand, 2011). Almanya’da yapılan çalışmada ise Alman halkının günlük HCA alımının ortalama 103 ng olduğu belirtilmektedir. Singapur halkının günlük HCA alımı 49,95 ng olarak belirtilmektedir (Rohrman et al., 2007).

Avrupa’nın 10 ülkesinde 1992 yılında EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) tarafından başlatılan ve 10 yıllık bir araştırma planı çerçevesinde beslenme ve kanser ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışma sonuçlarından bir tanesi de toplumun beslenme alışkanlıklarına göre günlük HCA alımının hesaplanması olmuştur. İsveç halkının günlük HCA alımı ile ilgili Malmö Diyet ve Kanser Topluluğunun 8599 kadın ve 6575 erkek üzerinde yaptığı çalışmaya göre günlük HCA alımı kadınlarda 583 ng, erkeklerde ise 821 ng bulunmuştur. En yüksek HCA alan gruplar genç yaşta kişiler, fazla kilolular, hareketsiz yaşam tarzına sahip olanlar ve sigara kullananlar olarak belirtilmiştir (Ericson et al., 2007).

Birçok epidemiyolojik çalışmada günlük et alımı ile kanser arasında bir ilişki olduğu belirtilmiş olmasına rağmen kanser oluşumunda etlerle alınan HCA’larla bağlantı kurmanın zor olduğu belirtilmektedir (Sinha et al., 1998).

Yukarıda yapılan araştırmalara göre bu tezde bulunan değerler günlük alım düzeylerinin altında görülmektedir.

Genel olarak sucuktaki toplam HCA miktarının diğer et ürünlerine nazaran daha düşük olduğunu söyleyebiliriz. Aynı zamanda pişirme yönteminin de toplam HCA oluşumunu etkilediğini ve karşılaştırılan çalışmalara göre daha düşük seviyelerde HCA içeriğine sahip olduğunu da bu çalışmada görmekteyiz.

Bu tez çalışması; sucuk örneklerinin ilk defa HCA içeriğinin belirlenmesi, 3 farklı pişirme koşullarında hangi miktarlar da HCA oluştuğunun ortaya konması, literatürdeki farklı et gruplarının HCA içerikleri ile bu çalışmanın sonuçlarının karşılaştırılması açısından önem taşımaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda sucuğun üretim basamaklarının, üretimde kullanılan hammaddenin ve depolamanın sucukta HCA oluşumuna etkisinin araştırılması önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahn, J. and Grün, I.U.**, 2005, Heterocyclic Amines: 2. Inhibitory Effects of Natural Extracts on the Formation of Polar and Nonpolar Heterocyclic Amines in Cooked Beef, *Food Chemistry and Toxicology*, 70(4):263-268pp.
- Anon.**, 2000, AOAC 990.03.2000, USA.
- Anon.**, 2001, Et Ve Et Mamulleri - Rutubet Muhtevası Tayini, TS 1743 ISO 1442, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1-6s.
- Anon.**, 2002, TS 1070 , Türk Sucuğu, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anon.**, 2012, Türk Gıda Kodeksi Et Ve Et Ürünleri Tebliği, 2012(74):28488s, Ankara.
- AOAC Methods**, 1990, Official Methods for Analysis, 15th ed. (Vol II)., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Balogh, Z., Gray, J. I., Gomaa, E. A. and Booren, A. M.**, 2000, Formation and Inhibition of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Ground Beef Patties, *Food and Chemical Toxicology*, 38:395-401pp.
- Basira, G.**, 1998. Heterocyclic Amines in Fresh And Processed Meat Products, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:4680–4687pp.
- Bordas, M., Moyano, E., Puignou, L. and Galceran, M. T.**, 2004, Formation and Stability of Heterocyclic Amines in a Meat Flavour Model System Effect of Temperature, Time and Precursors, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802:11–17pp.
- Bilge, G.**, 2010, Sucukta Üretim Sırasında Meydana Gelen Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Değişmelere üretim Sıcaklığının ve Starter Kültürün Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 118s (Yayınlanmamış).
- Bradford, M.M.**, 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254pp.
- Britt, C., Gomaa, E. A., Gray, J. I. and Booren, A. M.**, 1998, Influence of Cherry Tissue on Lipid Oxidation and Heterocyclic Aromatic Amine Formation in Ground Beef Patties, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:4891-4897pp.
- Busquets, R., Bordas, M., Toribio, F., Puignou, L. and Galceran, M. T.**, 2004, Occurrence of Heterocyclic Amines in Several Home-Cooked Meat Dishes of the Spanish Diet, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802:79–86pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Canlı, E.**, 2012, Yüksek Sıcaklıkta Pişirilmiş Bazı Geleneksel Gıdaların Heterosiklik Aromatik Amin İçeriklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73s.
- Cemeroğlu, B.**, 2007, Gıda Analizleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 45-125s.
- Cheng, K.W., Chen, F. and Wang, M.**, 2006. Heterocyclic Amines: Chemistry and Health, *Molecular Nutrition & Food Research*, 50:1150 – 1170pp.
- Çicek, Ü., Bulgan, A.**, 2013, Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aminler, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30 (1): 25-3s.
- Choi, Y.M., Lee, S.H., Choe, J.H., Rhee, M.S., Lee, S.K., Joo, S.T. and Kim, B.C.**, 2010, Protein Solubility is Related to Myosin Isoforms, Muscle Fiber Types, Meat Quality Traits, and Postmortem Protein Changes in Porcine *Longissimus Dorsi* Muscle, *Livestock Science*, 127(2-3):183-191pp.
- Dündar, A.**, 2011, Farklı Sıcaklık ve Sürelerde Pişirilen Köftelerde Heterosiklik Aromatik Aminlerin Oluşumunun Sınırlandırılmasında Optimum Tuz, Askorbik Asit ve Yağ Kullanım Seviyelerinin Yanıt Yüzey Yöntemiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 106s(Yayınlanmamış).
- Ekici, L., Sağdıç, O. ve Yetim, H.**, 2012, Et Tüketimi ve Kanseri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28(2):136-145s.
- Ericson U., E Wirfa, E., Mattisson, I., Gullberg, B., and Skog, K.**, 2007, Dietary Intake of Heterocyclic Amines, *Public Health Nutrition*, 10(6): 616–627pp.
- Fay, L.B., Ali, S. and Gross, G.A.**, 1997, Determinations Heterocyclic Aromatic Amines in Food Products: Automation of the sample Preparation Method Prior to HPLC and HPLC-MS Quantification, *Mutation Research*, 376:29-35pp.
- Felton, J.S., Knize, M.G., Shen, N.H., Lewis, P.R., Andresen, B.D., Happe, J. And Hatch, P.R.**, 1986, The Isolation and Identification of a New Mutagen from Fried Ground Beef: 2-Amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, 7(7):1081-1086pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Felton, J. S. and Knize, M. G.,** 1991, Occurrence, Identification and Bacterial Mutagenicity of Heterocyclic Amines in Cooked Food, *Mutation Research*, 259:205 -217pp.
- Felton, J. S., Fultz, E., Dolbeare, F. A. and Knize, M. G.,** 1994, Reduction of Heterocyclic Aromatic Amine Mutagens/Carcinogens in Fried Beef Patties by Microwave Pretreatment, *Food and Chemical Toxicology.*, 32 (10):897-903pp.
- Felton, J. S., Jägerstad, M., Knize, M. G., Skog, K. and Wakabayashi, K.,** 2000, Contents in Foods, Beverages and Tobacco, *Baffins Lane, Chichester, West Sussex*, 373pp.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H.,** 1957, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509pp.
- Gi, U.S., Baltes, W. and Labuza,, T.P.,** 1994, Maillard Reactions in Chemistry, *Food and Health, Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 106pp.
- Grivas, S.,** 2000, Organic Synthesis of the Heterocyclic Amines, *Baffins Lane, Chichester, West Sussex*, 373, England.
- Güven, G.,** 2009, Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aminlerin Oluşumu, Analiz Yöntemleri ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Analiz 35*, 8-10s.
- Hwang, D. and Ngadi, M.,** 2002, Kinetics of Heterocyclic Amines Formation in Meat Emulsion at Different Fat Contents, *Lebensm, Lebensm Wiss u Technology*, 35:600-606pp.
- Hugas, M., and Monfort, J.M.,** 1997, Bacterial Starter Cultures For Meat Fermentation, *Food Chemistry*, 59(4):547-554pp.
- Jackson, L. S. and Hargraves, W. A.,** 1995, Effects of Time and Temperature on the Formation of MeIQx and DiMeIQx in a Model System Containing Threonine, Glucose, and Creatine, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43:1678-1684pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jägerstad, M. and Laser-Reuterswård, A., Olsson, R., Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K. and Dahlqvist, A.,** 1983, Creatin(ine) and Maillard Reaction Products as Precursors of Mutagenic Compounds: Effects of Various Aminoacids, *Food Chemistry*, 12:255-264pp.
- Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P. and Solyakov, A.,** 1998, Chemistry, Formation and Occurrence of Genotoxic Heterocyclic Amines Identified in Model Systems and Cooked Foods, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 207:419– 427pp.
- Johansson, M. and Jägerstad, M.,** 1993, Influence of Oxidized Deep-Frying Fat and Iron on the Formation of Food Mutagens in a Model System, *Food and Chemical Toxicology*, 31 (12): 971-979pp.
- Johansson, M. A. E., Fredholm, L., Bjerne, I. and Jägerstad, M.,** 1995, Influence of Frying Fat on the Formation of Heterocyclic Amines in Fried Beefburgers and Pan Residues, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (12):993-1004pp.
- Kataoka, H. and Kijima, K.,** 1997, Analysis of Heterocyclic Amines as their N-dimethylaminomethylene Derivatives by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Selective Detection, *Journal Chromatography A*, 767:187–194pp.
- Keating, G. A., Layton, D. W. and Felton, J. S.,** 1999, Factors Determining Dietary Intakes of Heterocyclic Amines in Cooked Foods, *Mutation Research*, 443:149-156pp.
- Keating, G.A. and Bogen, K.T.,** 2004, Estimates of Heterocyclic Amine Intake in the US Population, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802(1):127-33pp.
- Keşkekoğlu, H.,** 2012, Nar Çekirdeği ve Üzüm Çekirdeği Özütlelerinin Farklı Et Ürünlerinde ve Farklı Pişirme Şartlarında HCA Oluşumuna Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 112s (Yayınlanmamış).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Keşkekoğlu, H. and Üren, A.,** 2013, Inhibitory Effects of Pomegranate Seed Extract on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Beef and Chicken Meatballs After Being Cooked By Four Different Methods, *Meat Science*, 96(4):1446-1451pp.
- Keşkekoğlu, H. ve Üren, A.,** 2014, Pişirme Koşullarının Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Amin Oluşumuna Etkileri, *Analiz 35*, 42-48s.
- Khan, M.R., Bertus, L.M., Busquets, R. and Puignou, L.,** 2009, Mutagenic Heterocyclic Amine Content in Thermally Processed Offal Products, *Food Chemistry*, 112:838–843pp.
- Kızıl, M. ve Besler, H.T.,** 2012, Heterosiklik Aromatik Amin Oluşumunun Önlenmesi veya Azaltılması, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(2):191-196s.
- Lan, C., M., Kao, T., H. and Chen, B., H.,** 2004, Effects of Heating Time and Antioxidants on the Formation of Heterocyclic Amines in Marinated Food, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802:27–37pp.
- Liao, G.Z., Wang, G.Y., Xu X.L. and Zhou G.H.,** 2009, Effect of Cooking Methods on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Chicken and Duck Breast, *Meat Science* , 85(1):149-54pp.
- Meester C.,** 1998, Chemical Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines: The Results of Two European Projects Compared, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 207: 441-447pp.
- Milic, B. Lj., Djilas, S., M., and Canadanovic-Brunet, J., M.,** 1993, Synthesis of Some Heterocyclic Amino-imidazozaarenes, *Food Chemistry*, 46:273–276pp.
- Morita, N., Takagi, M., Ffinot P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F. and Liardon, R.,** 1990, The Maillard Reaction in Food Processing, *Human Nutrition and Physiology*, Birkhauser, Basel, 59pp.
- Murkovic, M.,** 2004, Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Model Systems, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802:3–10pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Murkoviç, M.**, 2007, Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384:139-146pp.
- Öz, F. ve Kaya, M.**, 2006, Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aromatik Aminlerin Belirlenmesi, *Atatürk Üniv. Ziraat Fak.Dergisi*, 37 (2):243-248s.
- Öz, F. ve Kaya, M.**, 2007, Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aromatik Amin Oluşumunun Engellenmesi, *Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38(1):121-126s.
- Öz, F. and Kaya, M.**, 2011, Heterocyclic Aromatic Amines in Meat, *Journal of Food Processing and Preservation*, 35:739–753pp.
- Özdestandan, Ö., Kaçar, E., Keşkekoğlu, H. and Üren, A.**, 2014, Development of a New Extraction Method for Heterocyclic Aromatic Amines Determination in Cooked Meatballs, *Food Analytical Methods*, 7(1):116-126pp.
- Pais, P. and Knize, M. G.**, 2000, Chromatographic and Related Techniques for the Determination of Aromatic Heterocyclic Amines in Foods, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747:139-169pp.
- Pfau, W., Rosenfold K and Young J.F.**, 2006, Formation of Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Prok From Duroc and Landrace Pigs Upon Feed Supplementation With Creatine Monohydrate, *Food and Chemical Toxicology*, 44:2086-2091pp.
- Rohrmann, S., Hermann, S and Linseisen, J.**, 2009, Heterocyclic Aromatic Amine Intake Increases Colorectal Adenoma Risk: Findings From A Prospective European Cohort Study, *The American Society for Nutrition*, 89:1418–24pp.
- Sahar, A., Portanguen, S., Kondjoyan, A. and Dufour, E.**, 2010, Potential of Synchronous Fluorescence Spectroscopy Coupled with Chemometrics to Determine the Heterocyclic Aromatic Amines in Grilled Meat, *European Food Research and Technology*, 231: 803–812pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sanz Alaejos, M., Ayala, J.H., Gonzalez, V. and Afonso, A.M.,** 2008, Analytical Methods Applied to the Determination of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 862:15 – 42pp.
- Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C. P., Knize, M. G., Brown, E. D., Swanson, C. A., Rhodes, D., Rossi, S., Felton, J. S. and Levander, O. A.,** 1998, Heterocyclic Amine Content in Beef Cooked by Different Methods to Varying Degrees of Doneness and Gravy made from Meat Drippings, *Food and Chemical Toxicology*, 36: 279-287pp.
- Shin, H.S., Park, H. and Park, D.,** 2003, Influence of Different Oligosaccharides and Inulin on Heterocyclic Aromatic Amine Formation and Overall Mutagenicity in Fried Ground Beef Patties, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51:6726-6730pp.
- Skog, K., Johansson, M. and Jae Gerstad, M.,** 1998, Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake, *Food and Chemical Toxicology*, 36:879-896pp.
- Skog, K.,** 2002, Problems Associated with the Determination of Heterocyclic Amines in Cooked Foods and Human Exposure, *Food and Chemical Toxicology*, 40:1197-1203pp.
- Skog, K.,** 2004, Blue Cotton, Blue Rayon and Blue Chitin in the Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines- A Review, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802: 39–44pp.
- Solyakov, A. and Skog, K.,** 2002, Screening for Heterocyclic Amines in Chicken Cooked in Various Ways, *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1205-1211pp.
- Soyer, A.,** 2002, Fermente Et Ürünlerinde Kaliteyi Etkileyen İç Faktörler, *Gıda*, 27(1):15-19s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sun, L., Zhang, F., Yong, W., Chen, S., Yang, M. L., Ling, Y., Chu, X. and Lin, J. M.,** 2010, Potential Sources of Carcinogenic Heterocyclic Amines in Chinese Mutton Shashlik, *Food Chemistry*, 123:647–652pp.
- Thiébaud, H. P., Knize, M. G., Kuzmicky, P. A., Hsieh, D. P. and Felton, J. S.,** 1995, Airborne Mutagens Produced by Frying Beef, Pork and Soy-based Food, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (10): 821-828pp.
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L. and Galceran, M. T.,** 2002, Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Heterocyclic Amines in Food, *Journal of Chromatography A*, 948:267–281pp.
- Toribio, F., Busquets, R., Puignou, L. and Galceran, M.,** 2007, Heterocyclic Amines In Griddled Beef Steak Analysed Using A Single Extract Clean-Up Procedure, *Food and Chemical Toxicology*, 45:667-675pp.
- Turesky, R. J., Bur, H., Huynh-Ba, T., Aeschbacher, H. U. and Milon, H.,** 1988, Analysis of Mutagenic Heterocyclic Amines in Cooked Beef Products by High Performance Liquid Chromatography in Combination with Mass Spectrometry, *Food and Chemical Toxicology*, 26 (6):501-509pp.
- Turesky, R.J. and Marchand L.L.,** 2011, Metabolism and Biomarkers of Heterocyclic Aromatic Amines in Molecular Epidemiology Studies: Lessons Learned From Aromatic Amines, *Chemical Research in Toxicology.*, 24(8):1169-214pp.
- Vitaglione, P. and Foglian, V.,** 2004, Use of Antioxidants to Minimize the Human Health Risk Associated to Mutagenic/Carcinogenic Heterocyclic Amines in Food, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802(1): 189-99pp.
- Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H., Loeb, L.A.,** 2004, Environmental and Chemical Carcinogenesis, *Seminars in Cancer Biology*, 14:473-486pp.
- Wong, K.Y., Su, J., Knize, M.G., Koh, W.P. and Seow, A.,** 2005, Dietary Exposure to Heterocyclic Amines in a Chinese Population, *Nutrition and Cancer*, 52:147–155pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zimmerli, B., Rhyh, P., Zoller, O. and Schlatter, J., 2001. Occurrence of Heterocyclic Aromatic Amines in the Swiss Diet: Analytical Method, Exposure Estimation and Risk Assessment, *Food Additives and Contaminants*, 18(6):533–551pp.

ÖZGEÇMİŞ



Burcu ACAR 1990 yılında Aydın/Yenipazar’da doğmuştur. Lise eğitimini 2007 yılında Nazilli Mehmet Akif Ersoy Lisesi’nde tamamlamıştır. 2008 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde okumaya hak kazanmıştır. 2009 yılında yatay geçiş yaparak Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde okumaya devam etmiştir. 2013 yılında lisans eğitimini tamamlayıp aynı sene Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Gıda Kimyası Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.