

Köfte Örneklerinin Pişirme Süreci, Kimyasal Bileşimi ve İçeriğinin Heterosiklik Aromatik Amin Oluşumu Üzerine Etkisi

Effect of Cooking Procedures, Chemical Composition and Ingredients of Meatballs on Heterocyclic Aromatic Amine Formation

Mevlüde Kızıl¹, H. Tanju Besler¹

¹ Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri, Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Heterosiklik aromatik aminler (HAA) pişmiş besinlerde ng/g düzeyinde bulunan, et ve balığın 150°C üzerinde pişirilmesi ile oluşan potansiyel besin kaynaklı mutajendir. Bu çalışmada, köfte örneklerinin heterosiklik aromatik amin içeriğinin belirlenmesi ve HAA oluşumunu etkileyen etmenlerin incelenmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Ankara’da toplu beslenme yapılan kurumlardan toplanan köfte örneklerinin 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinokzalin (IQx), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin (IQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin (MeIQx), 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin (7,8-DiMeIQx), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP), 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol (AaC) ve 2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol (MeAaC) içerikleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir. **Bulgular:** Köfte örneklerinde IQ (1.02 ng/g), PhIP (0.99 ng/g) MeIQ (0.79 ng/g), MeIQx (0.55 ng/g), AaC (0.43 ng/g) farklı düzeylerde saptanmıştır. IQx (0.12 ng/g), 7,8-DiMeIQx (0.09 ng/g), 4,8-DiMeIQx (0.10 ng/g) ise eser miktarda belirlenmiştir. HAA oluşumuna etki eden etmenler olarak pişirme süresi ile MeIQx ($p<0.01$), MeIQ ($p<0.05$) ve PhIP ($p<0.01$) arasında, köftelerin yağ yüzdesi ile MeIQ arasında pozitif anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca, köftelere eklenen kırmızıbiber ile MeIQx ($p=0.05$) ve PhIP ($p<0.01$) arasında negatif ilişki saptanmıştır. **Sonuç:** Köfte örneklerinde farklı düzeyde HAA saptanmış, IQ, PhIP ve MeIQ en fazla bulunan HAA’lar olarak belirlenmiştir. Ayrıca pişirme süresi, köftelerin yağ yüzdesi ve köftelere kırmızıbiber ekleme HAA oluşumuna etki eden etmenler olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Heterosiklik aromatik amin, köfte, baharat, pişirme prosedürü, katı faz ekstraksiyonu

ABSTRACT

Aim: Heterocyclic aromatic amines (HCAs) are potent food mutagens at ng/g levels in cooked foods formed during cooking of meat and fish at temperatures above 150°C and the aim of this study was to determine HCA contents of meatball samples and investigate the factors that affect HCA formation. **Material and Methods:** 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline (IQx), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (7,8-DiMeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AaC) and 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAaC) contents in meatball samples obtained from mass catering in Ankara were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Results:** IQ (1.02 ng/g), PhIP (0.99 ng/g) MeIQ (0.79 ng/g), MeIQx (0.55 ng/g), AaC (0.43 ng/g) were detected at various levels in meatball samples. On the other hand IQx (0.12 ng/g), 7,8-DiMeIQx (0.09 ng/g), 4,8-DiMeIQx (0.10 ng/g) were determined at trace levels. As the factors that affect HCA formation, positive correlations were found between cooking time and MeIQx ($p<0.01$), MeIQ ($p<0.05$) and PhIP ($p<0.01$) level. In addition, negative correlations were found between red pepper and MeIQx ($p=0.05$) and PhIP ($p<0.01$) level. **Conclusion:** Varied levels of HCAs were determined in meatball samples, IQ, PhIP and MeIQ were major HCAs in this study. Cooking time, fat percentage of meatballs and added red paper amount were also found effective factors for HCA formation.

Keywords: Heterocyclic aromatic amine, meatball, spice, cooking procedure, solid phase extraction

GİRİŞ

Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmaları kanser gelişiminde diyetin önemli rol oynadığını göstermektedir ve insan kanserlerinin 1/3’ünün diyetle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (1-3).

Heterosiklik aromatik aminler (HAA) pişmiş besinlerde ng/g düzeyinde bulunan ve insan kanserlerinin etiolojisinde önemli rol oynayan mutajenik bileşiklerdir (3).

İletişim/Correspondence:

Dr. Mevlüde Kızıl

Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, D Blokları, 06100 Sımanpazarı, Ankara, Türkiye

E-posta: mkizil@hacettepe.edu.tr

Geliş tarihi/received: 11.07.2013

Kabul tarihi/accepted: 23.08.2013

Pişmiş besinlerde HAA'lar ilk kez 1977 yılında Japon bilim insanları tarafından keşfedilmiştir (4). Bugüne kadar ise 25'den fazla mutajenik/karsinojenik HAA'lar pişmiş besinlerden izole edilmiştir (5). HAA'lar IQ-tip (aminoimidazoazorenler) ve IQ-tip olmayan (aminokarbolinler) olmak üzere başlıca 2 ana grup altında sınıflandırılmaktadır. IQ-tip HAA'lar kreatin(in), aminoasit ve şekerin reaksiyonunu içeren ve Maillard reaksiyonu olarak bilinen enzimatik olmayan kahverengileşme reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Buna karşın, aminokarbolinler 300°C üzerindeki yüksek sıcaklıkta aminoasit ve proteinlerin pirolizi ile oluşmaktadır (5,6). Etin cinsi, pişirme prosedürü, pH, su aktivitesi, öncü maddeler (karbonhidrat, serbest aminoasit, kreatin), ısı ve kütle transferi, yağ miktarı, yağ oksidasyonu, antioksidanlar pişmiş etlerde HAA içeriğini ve çeşidini etkileyen ana parametreler olarak değerlendirilmektedir (7,8). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) pişmiş besinlerde bulunan bazı HAA'ların 2A (IQ) ve 2B (MeIQ, MeIQx, PhIP) sınıfı muhtemel insan karsinojeni olduğu sonucuna varmıştır (9). Bu nedenle besinlerde HAA oluşumunun en aza indirilmesi ve bu bileşiklerin maruziyetinin azaltılması önerilmektedir (8).

Birçok çalışmada doğal ve sentetik antioksidanların HAA oluşumunu engellediği ve mutajenik aktiviteyi azalttığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda biberiye oleoresin (10), virjin zeytinyağına eklenen biberiye ekstraktı (11), oleoresin veya üzüm çekirdeği ekstraktı (12), baharat içeren marinadlar (13), kırmızı ve karabiber eklemenin (14,15) HAA oluşumunun etkili engelleyicisi olabileceği belirtilmektedir. Türkiye'de toplu beslenme yapılan kurumlarda sıklıkla tüketilen köftelerin HAA içeriğinin ve HAA içeriğine etki eden etmenlerin literatürde henüz çalışılmamış olması nedeniyle bu çalışmada toplu beslenme yapılan kurumlardan alınan köfte örneklerinin heterosiklik aromatik amin içeriğinin belirlenmesi ve HAA oluşumunu etkileyen etmenlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar

Analiz esnasında kullanılan bütün kimyasallar ve çözeltiler analitik veya Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) grade kalitesindedir ve bütün çözeltiler 0.45 µ'luk filtreden geçirildikten sonra kullanılmıştır.

Köfte Örnekleri

Bu çalışmada 60 adet fırında pişirme ve ızgara/barbekü pişirme yöntemleri uygulanmış köfte örneği sebzesiz ve sossuz olarak kolay çalışma ortamı sağlayabilen toplu beslenme yapılan kurumlardan (bir hastane mutfak ve bir kafeteryadan) toplanmıştır. Ayrıca köfteye eklenen baharat, su tutucu maddeler, sarmısak, soğan gibi antioksidan bileşik içeren maddeler ve bu maddelerin kullanım gramajları alınmıştır. Köfte örneklerinin pişirme sıcaklıkları, iç sıcaklıkları ve pişirme süreleri kaydedilmiştir. Pişirme sıcaklığı ölçmek için yüzey termometresi (Testo®905-T2) kullanılmıştır. Köfte örneklerinin iç sıcaklıkları probe termometre (Testo®905-T1) ile ölçülmüş, pişirme süresi ise kronometre ile saptanmıştır.

Pişirme ile ağırlık kaybı, örneklerin pişirme öncesi ağırlıklarının ölçümü ve pişirmeyi takiben oda sıcaklığında 30 dakika soğuması sağlandıktan sonra pişmiş ağırlığının ölçümü arasındaki fark ile belirlenmiş ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Örnekler mutfak robotu (Tefal, France) ile homojenize edilmiş ve aliminyum folyoya sarılarak -20 °C'de saklanmıştır. Analizden 1 gün önce 4 °C'de 12-24 saat sürede çözündürülmesi sağlanmıştır.

Köfte Örneklerinin Kimyasal Analizi

Köfte örneklerinin nem, yağ ve pH analizleri iki tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. Köfte örneklerinde nem tayini Sartorius® MA150 nem tayin cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toplam yağ analizi için homojenize edilmiş örnekten 5 g paralelli olarak tartılıp 103±2 °C'lik etüvde suyu uçurulduktan sonra soxhlet yöntemine göre 8 saat petrol eteri ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Köfte örneklerinin pH analizi için 10 g örnek paralelli olarak

tartıldıktan sonra üzerine 100 mL saf su eklenmiş ve karıştırıcı yardımıyla homojenizasyonu sağlanmıştır. Homojenat süzöldükten sonra pH 4 ve pH 7 ile kalibre edilmiş pH metre süzüntüye daldırılarak ölçüm yapılmıştır (16).

Heterosiklik Aromatik Aminlerin Ekstraksiyonu

HAA ekstraksiyonu, orijinal olarak Gross ve Grüter (17) tarafından geliştirilen Messner ve Murkovic (18) tarafından modifiye edilen yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemle göre 1 g pişmiş köfte örneğine 12 mL 1 M NaOH ilave edilerek 500 rpm devirde 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Üzerine 13g Extrelut NT paketleme materyali konularak bir spatülle iyice karıştırılır ve boş extrelut kolonuna (diatomacesus earth ekstraksiyon kartuşu) aktarılır. Oasis MCX kartuşları vakum sistemine bağlandıktan sonra 2 mL etil asetat ile yıkanır. Ardından diatomacesus earth ekstraksiyon kartuşları sisteme takılarak paketleme yapılır ve etil asetat ile yıkanır. Oasis kartuşları önce 2 mL 0.1 M HCl ile sonra 2 mL metanol ile tekrar yıkanıp 4 mL'lik vial şişeye 2 mL metanol: NH₃ (%25) (19:1) ile elue edilir. Analiz öncesinde bu karışım 50°C'lik etüvde kurutulmuş, analizden hemen önce 100 µL MeOH ilave edilerek çözdürülür ve bu karışım HPLC analizi için kullanılmıştır.

Heterosiklik Aromatik Aminlerin Analizi

Örneklerin HPLC analizi UV dedektörlü Thermo Finnigan3000 HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analitik kolon olarak bir ters faz materyali olan Semi Micro ODS-80 TS kolon (5µm, 250 mm×2 mm i.d.) kullanılmıştır (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany). Ayrım Solvent A (Methanol/Asetonitril/Su/Glasiyel asetik asit'in 8/14/76/2 oranında karıştırılması ile elde edilen çözeltinin %25'lik NH₃ ile pH'sının 5'e ayarlanması ile elde edilmiştir) ve Solvent B (Asetonitril) gradient elüsyon ile 0.3 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Gradient programı, 0–12 dk, %0 B, 12–20 dk, %0–30 B, 20–35 dk, %30 B olarak ayarlanmıştır.

HAA'ların geri kazanım oranlarını belirlemek için standart ilave yöntemi kullanılmıştır. Bunun

için ekstraksiyon öncesinde bilinen örneğe farklı düzeylerde bilinen konsantrasyonlarda mix stok solüsyon (mix 0.1, 0.5, 1, 2.5 ve 5 ng) eklenmiştir. HAA'ların geri kazanım oranları IQx için %78, IQ için %65, MeIQx için %76, MeIQ için %79, 7,8-DiMeIQx için %73, 4,8-DiMeIQx için %78, PhIP için %98, AαC için %62, MeAαC için %68 olarak bulunmuştur. Belirli konsantrasyonlardaki HAA karışımından belirlenen Sinyal/Gürültü (S/N) oranlarına göre hesaplanan LOD (limit of detection=3) ve LOQ (limit of quantification=10) değerleri ise Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. HAA'ların S/N oranlarına göre LOD ve LOQ değerleri

HAA	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
IQx	0.003	0.01
IQ	0.002	0.01
MeIQx	0.006	0.02
MeIQ	0.005	0.02
7,8DiMeIQx	0.003	0.01
4,8DiMeIQx	0.005	0.02
PhIP	0.005	0.02
AαC	0.008	0.03
MeAαC	0.008	0.03

Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Köfte örneklerinin pişirme sıcaklığı, pişirme süresi, yağ ve nem içeriği, pH değeri ile baharat ve çeşni vericilerin HAA oluşumuna etkisi Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir (19). Tüm istatistiksel testlerde en düşük önemlilik düzeyi 0.05 olarak alınmıştır. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Köfte Örneklerinin İşlem Süreci ve Kimyasal Analizi

Bu çalışmada köfte örneklerinin ortalama pişirme sıcaklığı 168.44°C, iç sıcaklıkları ise 78.59°C olarak saptanmıştır. Diğer yandan örneklerin pişirme süreleri birbirinden farklılık göstermektedir ve ortalama pişirme süresinin 36.81 dk olduğu saptanmıştır.

Örneklerin kimyasal analizleri incelendiğinde çiğ köfte örneklerinin ortalama yağ içeriği %12.17, nem içeriği %57.66, pH'ı ise 5.77 olarak bulunmuştur. Pişirme sonrası ağırlık kayıpları ortalama %20.04 olarak saptanmıştır. Tablo 2'de

Tablo 2. Köfte örneklerinin işlem süreci özellikleri ve kimyasal analizlerinin ortalama, standart sapma (S), en düşük ve en yüksek değerleri (n= 60)

Değişkenler	\bar{x}	S	En düşük	En yüksek
Piştirme sıcaklığı (°C)	168.44	19.11	150.00	208.00
İç sıcaklık (°C)	78.59	4.35	71.00	86.90
Piştirme süresi (dk)	36.81	28.98	4.00	90.00
Yağ (%)	12.17	4.97	3.59	21.92
Nem (%)	57.66	4.65	47.45	66.44
pH	5.77	0.08	5.58	5.93
Ağırlık kaybı (%)	20.04	7.02	6.16	31.27

köfte örneklerinin işlem süreci özellikleri ve kimyasal analizlerinin ortalama, standart sapma (S), en düşük ve en yüksek değerleri verilmiştir.

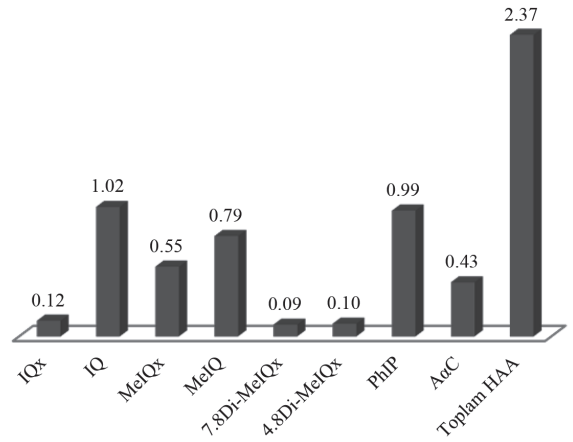
Köfte Örneklerinin HAA İçerikleri

Köfte örneklerinde değişik düzeylerde HAA saptanmıştır. IQ, PhIP ve MeIQ en fazla bulunan HAA'lar olarak belirlenmiştir. IQ en yüksek düzeyde saptanan HAA olarak saptanmış ve köfte örneklerinde ortalama 1.02 ng/g bulunmuştur. PhIP, IQ'dan sonra en yüksek düzeyde bulunmuş ve köfte örneklerinin ortalama PhIP düzeyi 0.99 ng/g olarak belirlemiştir. MeIQ ise köfte örneklerinde 0.79 ng/g olarak saptanmıştır. Diğer yandan MeIOx (0.55 ng/g) ve AaC (0.43 ng/g) düşük miktarda bulunurken IQx (0.12 ng/g), 7,8-DiMeIQx (0.09 ng/g), 4,8-DiMeIQx (0.10 ng/g) eser miktarda belirlenmiştir. MeAaC (0.61 ng/g) ise sadece bir örnekte saptanmıştır. Köfte örneklerinin ortalama HAA içerikleri Şekil 1'de verilmiştir.

İşlem Süreci ve Kimyasal Bileşim ile HAA Düzeyi Arasındaki İlişki

Köfte örneklerinin HAA düzeyleri ile yağ, nem, pH değerleri, piştirme sıcaklığı ve süresi ile ağırlık kaybı arasındaki ilişki incelendiğinde köftelerin

piştirme sonrası ağırlık kaybı ile AaC düzeyleri arasında pozitif ilişki bulunmuştur ($r=0.426$ $p<0.05$). Ayrıca piştirme süresi ile MeIQx ($r=0.706$ $p<0.01$), MeIQ ($r=0.428$ $p<0.05$) ve PhIP ($r=0.454$ $p<0.01$) arasında da pozitif ilişki saptanmıştır. Diğer yandan köftelerin çığ yağ yüzdesi ile MeIQ arasında pozitif anlamlı ilişki bulunmuştur. Tablo 3'de köfte örneklerinin yağ ve nem içeriği, pH değeri, ağırlık kaybı, piştirme sıcaklığı, piştirme süresi ve iç sıcaklığı ile HAA düzeyleri arasındaki ilişki verilmiştir.

**Şekil 1.** Köfte örneklerinin ortalama HAA içerikleri**Tablo 3.** Köfte örneklerinin yağ ve nem içeriği, pH değeri, ağırlık kaybı, piştirme sıcaklığı, piştirme süresi ve iç sıcaklığı ile HAA düzeyleri arasındaki ilişki

Değişkenler	Heterosiklik aromatik aminler								
	IQx	IQ	MeIQx	MeIQ	7,8Di-MeIQx	4,8Di-MeIQx	PhIP	AaC	Toplam HAA
Piştirme sıcaklığı	-0.098	-0.080	-0.430	-0.168	-0.045	0.500	0.000	0.061	0.163
İç sıcaklık	0.244	-0.019	0.208	0.100	0.309	-1.000	0.226	0.265	0.090
Piştirme süresi (dk)	0.120	-0.061	0.706**	0.428*	0.039	-0.500	0.454**	0.168	-0.029
Yağ (%)	0.224	0.166	0.274	0.480*	-0.462	-1.000	-0.100	-0.102	0.163
pH	0.083	0.084	0.122	0.141	-0.442	-0.500	-0.249	-0.076	0.085
Nem (%)	-0.106	-0.067	-0.098	-0.158	0.441	1.000	0.139	-0.025	-0.066
Ağırlık kaybı (%)	0.169	0.150	0.122	0.192	-0.074	-0.500	0.086	0.426*	0.131

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Tablo 4. Köftelere eklenen baharat ve çeşni vericilerin HAA düzeyleri ile ilişkisi

Baharat ve çeşni vericiler	Heterosiklik aromatik aminler							Toplam HAA
	IQx	IQ	MeIQx	MeIQ	7.8Di-MeIQx	PhIP	AαC	
Kurusoğan (%7.7-11.5)	0.257	-0.179	0.346	0.145	-0.073	0.138	0.043	-0.174
Sarımsak (%1.5-2)	0.017	-0.146			-0.1	-0.12	0	-0.118
Karabiber (%0.38)	0.462**	0.188	0.409	0.318	-0.253	0.195	0.393**	0.032
Kırmızıbiber (%0.38-3.8)	0.246	0.114	-0.486*	0	-0.135	-0.520***	-0.027	0.116
Maydanoz (%3.8)		0.293	0.575**			0.283		-0.467***
Yumurta (%0-22.1)	0.211	-0.617	-0.791	-0.949**	-0.447	-0.534	-0.535	-0.023
Ekmek içi (%7.7-15.4)	0.286	0.440**	0.307	0.255		0.132	0.174	-0.327**

***p<0.01, **p<0.05, *p=0.05

Baharat ve Çeşni Vericiler ile HAA Düzeyi Arasındaki İlişki

Köftelere eklenen baharat ve çeşni vericiler ile HAA düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde karabiber ile IQx ($r=0.462$ $p<0.05$) ve AαC ($r=0.393$ $p<0.05$) arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Ayrıca köftelere eklenen kırmızıbiber ile MeIQx ($r=-0.486$ $p=0.05$) ve PhIP ($r=-0.520$ $p<0.01$) arasında negatif ilişki bulunmuştur. Diğer yandan köftelere eklenen maydanoz ile MeIQx ($r=0.575$ $p<0.05$) arasında pozitif ilişki saptanırken toplam HAA düzeyi ($r=-0.467$ $p<0.01$) ile negatif ilişki saptanmıştır.

Köftelerin yapımında kullanılan yumurta ile MeIQ düzeyi ($r=-0.949$ $p<0.05$) arasında negatif ilişki saptanmış, ekmek içi ile IQ düzeyi ($r=0.440$ $p<0.05$) arasında pozitif ilişki saptanırken toplam HAA düzeyi ($r=-0.327$ $p<0.05$) arasında negatif ilişki bulunmuştur. Tablo 4’de köftelere eklenen baharat ve çeşni vericilerin köftelerin HAA düzeyleri ile ilişkisi verilmiştir.

TARTIŞMA

Köfte Örneklerinin HAA İçerikleri

Bu çalışmada, köfte örneklerinde çeşitli düzeylerde HAA belirlenmiştir. IQ, PhIP ve MeIQ bu en yüksek düzeyde bulunurken, IQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx ve MeAαC düşük miktarlarda veya eser miktarda saptanmıştır. Literatürde pişmiş ette en fazla bulunan HAA’lar, PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, IQ ve MeIQ olarak rapor edilmektedir (8,10). Fakat bu çalışmada 4,8-DiMeIQx düşük düzeyde saptanmıştır. Bu çalışmaya benzer olarak ticari pişmiş etlerde 4,8-DiMeIQx’in düşük düzeyde bulunduğu

çalışmalar mevcuttur (20,21). Bu çalışmada analiz edilen köfte örnekleri de ticari olarak pişirilmiş köftelerdir benzer sonuçlar elde edilmesinin benzer pişirme prosedürünün uygulanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

IQ bu çalışmada en yüksek düzeyde bulunan HAA’dır ve köfte örneklerinin ortalama IQ içeriği 1.02 ng/g olarak bulunmuştur. Bu çalışmayı destekler nitelikte birçok çalışmada benzer düzeylerde IQ saptanmıştır (22,23). Yemeye hazır ticari olarak pişirilmiş köfte örneklerinde benzer olarak 0.94 ng/g IQ bulunmuştur (22). Başka bir çalışmada ise hamburgerlerde 0.58 ng/g IQ belirlenmiştir (23). PhIP bu çalışmada IQ’dan sonra en yüksek düzeyde belirlenmiştir (0.99 ng/g). Pişmiş etlerde PhIP düzeyinin incelendiği çalışmalarda, Warzecha ve arkadaşları (24) 150-160°C’de 20 dk tavada yağsız kızartılan dana etinde 1.9 ng/g PhIP saptamış, fakat Oz ve arkadaşları (25) 200°C’de 2-8 dk ızgara edilmiş dana etinde PhIP belirleyememiş, buna karşın 1.5-6 dk barbekülenmiş dana etinde saptanabilir sınırın altında ile 3.61 ng/g aralığında PhIP belirlemişlerdir. Ayrıca Klassen ve arkadaşları (23) ticari hamburgerlerde PhIP değerinin 1.38 ng/g olduğunu belirtmiştir. Ticari hamburgerlerle yürütülen başka bir araştırmada da PhIP 0.1-0.6 ng/g arasında bulunmuştur (26). Bu çalışmada ticari olarak pişirilmiş köfte ve hamburgerlerde benzer IQ ve PhIP düzeylerinin elde edilmesi yine benzer pişirme prosedürünün uygulanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada MeIQ 0.79 ng/g olarak bulunurken diğer çalışmalarda, Abdulkarim ve Smith (27) 200-240°C’de 7-12 dk barbekü edilmiş dana etinde 0.38 ng/g, Rivera ve arkadaşları (28) 200-500°C’de 15 dk barbekü edilmiş dana etinde 8 ng/g MeIQ

saptamışlardır. Fakat Klassen ve arkadaşları (23) hamburger örneklerinde MeIQ içeriğinin 0.1 ng/g'dan az olduğunu, Busquets ve arkadaşları (6) ise 175–200°C arası sıcaklıklarda 11.2 dk kızartılan hamburgerlerde MeIQ içeriğinin belirlenebilir sınırın altında olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Balogh ve arkadaşları (10) 175°C'de 12 ile 20 dk kızartılan köftelerde 0.1-0.3ng/g MeIQ saptamıştır. Bu çalışmada MeIQ düzeyinin ticari hamburgerlerden daha yüksek olmasının köftelerin yağ içeriğinin daha yüksek olmasından kaynaklanmış olduğu söylenebilmektedir. MeIQx ise bu çalışmada 0.55 ng/g olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda ise ızgara edilmiş dana etinde Polak ve arkadaşları (29) 0.15 ng/g Murray ve arkadaşları (30) 0.5 ng/g MeIQx saptamışlardır.

Bu çalışmada, IQx, 7,8-DiMeIQx ve 4,8-DiMeIQx düşük miktarda veya eser miktarda saptanmış ve sırasıyla 0.12, 0.09 ve 0.10 ng/g olarak belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda barbekü pişirilmiş dana etinde 0.3-0.20 ng/g IQx (31) bulunurken, ızgara edilen dana etinde ise IQx belirlenememiştir (25). Busquets ve arkadaşları (6) ise bu çalışmaya benzer olarak tavada kızartılmış hamburgerlerde 0.04 ng/g 7,8-DiMeIQx ve 0.1 ng/g altında 4,8-DiMeIQx saptamışlardır. Ayrıca 4,8-DiMeIQx ve 7,8-DiMeIQx'in ticari olarak pişirilmiş dana etinde belirlenemediği veya eser miktarda belirlendiği belirtilmiştir (21).

Pişmiş etlerde AαC ve MeAαC düzeylerinin incelendiği çalışmalarda Toribio ve arkadaşları (32) 180-210°C'de 4 dk ızgara edilmiş dana etinde 0.33 ng/g AαC, 0.15 ng/g MeAαC teşhis etmişlerdir. Busquest ve arkadaşları (6) ise yine 180-210°C'de 4 dk ızgara edilen dana etinde 0.5 ng/g AαC, 0.4 ng/g MeAαC saptamışlardır. Bu çalışmada ise köfte örneklerinin ortalama AαC düzeyi 0.43 ng/g bulunurken, MeAαC sadece bir köfte örneğinde saptanmıştır.

Görüldüğü gibi literatürde pişmiş et ve et ürünlerinin HAA içeriklerinin analiz edildiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bu durum çalışmalarda kullanılan et türlerinin, etin orijininin, köftelerin veya etlerin hazırlama yöntemlerinin, pişirme prosedürünün, HAA analiz yöntemlerinin birinden farklı olmasından

kaynaklanmaktadır. Bu nedenle elde edilen sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılması güçtür.

İşlem Süreci ve Kimyasal Bileşim ile HAA Düzeyi Arasındaki İlişki

Etin yağ içeriğinin HAA oluşumu üzerinde hem artırıcı hem de azaltıcı etki gösterdiği belirtilmektedir ve HAA oluşumunda yağın etkisi hala iyi anlaşılamamıştır (33). Fakat bu çalışmada köftelerin çığ yağ yüzdesi ile MeIQ düzeyi ($r=0.480$ $p=0.05$) arasında pozitif ilişki bulunmuştur. Köftelerin ortalama çığ yağ oranı %12.17 olarak saptanmıştır. Knize ve arkadaşları (34) yağ içeriği %8'den %15'e çıktığında mutajenitenin arttığını belirtmiştir. Ayrıca birçok araştırmacı en fazla HAA oluşumu için optimum yağ düzeyinin kıyma halindeki ette %10-20 olarak belirlemiştir (35).

Pişirme süresi ile MeIQx, MeIQ ve PhIP arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Bu sonucu destekler nitelikte yakın zamandaki veriler pişirme sıcaklığı ve süresinin HAA oluşumunda kreatin, şeker ve serbest aminoasitler gibi öncü maddelerin varlığından daha önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (8). Ayrıca yakın zamandaki bir çalışmada pişirme sıcaklığı ve süresinin HAA oluşumunda en önemli etkiye sahip olduğu, özellikle bu etkinin MeIQ ve PhIP içeriği üzerine olduğu vurgulanmıştır (36).

Ağırlık kaybı ile AαC arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Yüksek pişirme kaybının HAA oluşumunun artmasıyla ilişkili olduğu çünkü pişirme süresince HAA oluşumu için gerekli suda çözünen öncü maddelerin etin iç kısmından su ile yüzeye taşındığı ve böylece yüzeyde HAA oluşumu için gerekli öncü maddelerin miktarının arttığı belirtilmektedir (11).

Baharat ve Çeşni Vericiler ile HAA Düzeyi Arasındaki İlişki

Baharat doğal antioksidan kaynağıdır ve baharatın HAA oluşumu üzerine etkileri çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Biberiye oleoresin, virjin zeytinyağına eklenen biberiye ekstraktı, oleoresin veya üzüm çekirdeği ekstraktı, baharat içeren

marinadlar, kırmızı ve karabiber ekleme HAA oluşumunun etkili engelleyicisi olabilmektedir (10-15).

Bu çalışmada, köftelere eklenen baharat ve çeşni vericiler ile HAA düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde karabiber ile IQx ve AαC arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Fakat Oz ve arkadaşları (15) 175, 200 ve 225°C'de kızartılan yüksek yağlı köftelere kızartma işleminden 12 saat önce köftenin yüzeyine %1 oranında karabiber eklemenin PhIP oluşumunu %100, toplam HAA oluşumunu %12-100 oranında azalttığını bildirmiştir. Aynı zamanda Johansson ve Jägerstad (37) yaptıkları araştırmada antioksidanların HAA oluşumunu azaltmadığını ve bu sonucun kullanılan antioksidanların model sistemde prooksidatif etki göstermesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada köftelere eklenen karabiber miktarı standart tarifede %0.38 olarak belirtilmektedir. Karabiberin HAA'lar üzerine azaltıcı bir etkisinin olmaması düşük miktarda kullanılmasından veya standart tarifeye uyulmayarak daha yüksek miktarda yani prooksidatif etki oluşturabilecek miktarda kullanılmış olmasından kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada kırmızıbiber ile MeIQx ve PhIP arasında negatif ilişki bulunmuştur. Oz ve arkadaşları (14) benzer olarak 175°C, 200°C, 225°C'de kızartılmış dana pizolalarına kızartma öncesinde %1 oranında kırmızı biber eklendiğinde toplam HAA miktarının %75-100 oranında azaldığını belirtmiştir. Köftelere eklenen kırmızıbiber miktarı standart tarifede genellikle %1.53 olarak belirtilmektedir ve bu çalışmada da kırmızıbiberin antioksidan aktivitesinin MeIQx ve PhIP oluşumunu azaltabileceği gösterilmektedir.

Köftelere eklenen maydanoz ile MeIQx arasında pozitif ilişki saptanırken toplam HAA düzeyi ile negatif ilişki saptanmıştır. Maydanoz gibi antioksidan öğeler içeren biberiye ile yapılan çalışmada, kıyma haline getirilmiş dana etine %1 ve %10 oranında biberiye eklendiğinde PhIP'de %44 azalma, IQ'da %72 azalma, MeIQ'da ise %1 ve %10 biberiye eklenmesine göre sırasıyla %80 ve %48 azalma sağladığı bildirilmiştir (10).

Bu çalışmada köftelere eklenen yumurta ile MeIQ düzeyi arasında negatif ilişki bulunmuştur. Yumurtanın HAA oluşumu üzerine etkisini inceleyen çalışma mevcut değildir fakat yumurtanın en fazla içerdiği aminoasitler arasında glutamik asit, aspartik asit, lösin, lizin ve serin yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda mutajenik aktivitenin farklı aminoasitler için farklı düzeylerde olduğu ve en yüksek mutajenik aktivitenin sırasıyla treonin, glisin ve lizinde olduğu saptanmıştır (38). Treonin ve glisin yumurtada en fazla bulunan aminoasitler olmaması nedeniyle köfteye yumurta eklemenin MeIQ oluşumunu azaltmış olabileceği söylenebilmektedir. Ayrıca bu çalışmada ekmek içi ile IQ düzeyi arasında pozitif ilişki saptanırken toplam HAA düzeyi arasında negatif ilişki bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda ekmek içi gibi su tutucu bileşiklerin HAA oluşumunu azaltabileceği bildirilmektedir (39).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Köfte örneklerinde farklı düzeyde HAA saptanmış, IQ, PhIP ve MeIQ en fazla bulunan HAA'lar olarak belirlenmiştir. Ayrıca pişirme süresi, köftelerin yağ yüzdesi ve köftelere eklenen kırmızıbiber HAA oluşumuna etki eden etmenler olarak belirlenmiştir. Toplu beslenme yapılan kurumlarda farklı pişirme yöntemleri uygulanmış tavuk, balık ve diğer kırmızı et yemeklerinin HAA içeriklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara devam edilmelidir. Toplu beslenme yapılan kurumlarda HAA oluşumunu azaltmak açısından köftelere antioksidan içeren baharat ve çeşni vericilerin eklenmesi, uzamış pişirme süresinden kaçınılması, etlerin satın alınmasında yağ oranı yüksek etlerin satın alınmaması önerilmektedir.

Çıkar çatışması/Conflict of interest: Yazarlar ya da yazı ile ilgili bildirilen herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR

1. Goldman R, Shields P. Food mutagens. J Nutr 2003;133:965S-973S.
2. Kulp KS, Fortson SL, Knize MG, Felton JS. An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. Food Chem Toxicol 2003;41(12):1701-1710.
3. Sugimura T. Food and cancer. Toxicology 2002;181(182):17-21.

4. Nagao M, Honda M, Seino Y, Yahagi T, Sugimura T. Mutagenicities of smoked condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett* 1977;2:221–226.
5. Sanz-Alaejos M, Ayala JH, González V, Afonso AM. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J Chromatogr B* 2008;862:15–42.
6. Busquets R, Bordas M, Toribio F, Puignou L, Galceran MT. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J Chromatogr B* 2004;802:79–86.
7. Oz F, Kaban G, Kaya M. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chem* 2007;104:67–72.
8. Oz F, Kaya M. Heterocyclic aromatic amines in meat. *J Food Process Pres* 2011; 35:739-753.
9. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In *Some Natural Occurring Substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Amines and Mycotoxins*, Vol 56 sf. 163–242, International Agency for Research on Cancer, Lyon; 1993.
10. Balogh Z, Gray JI, Gomaa EA, Booren AM. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem Toxicol* 2000;38:395–401.
11. Persson E, Graziani G, Ferracane R, Fogliano V, Skog K. Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1587–1597.
12. Ahn J, Grun IU. Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *J Food Sci* 2006;70:263–268.
13. Smith JS, Ameri F, Gadgil P. Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. *J Food Sci* 2008;73:100–105.
14. Oz F, Kaya M. The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef *Longissimusdorsi* muscle. *J Food Process Preserv* 2011;35(6):806-812.
15. Oz F, Kaya M. The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. *Food Control* 2011;22:596–600.
16. Vural H, Öztan A. Et ve ürünleri kalite kontrol laboratuvarı uygulama kılavuzu. H.Ü Mühendislik Fakültesi Yayınları, Yayın No:36, Ankara; 1996.
17. Gross GA, Gruter A. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J Chromatogr* 1992;592:271–278.
18. Messner C, Murkovic M. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J Chromatogr B* 2004;802:19-26.
19. Ural A, Kılıç İ. Bilimsel araştırma süreci ve SPSS ile veri analizi. Detay yayıncılık, Ankara, 2005.
20. Tikkanen LM, Sauri TM, Latva-Kala KJ. Screening of heat-processed Finnish foods for the mutagens 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]-quinoxaline, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Food Chem Toxicol* 1993;31:717–721.
21. Wong KY, Su J, Knize MG, Koh WP, Seow A. Dietary exposure to heterocyclic amines in a Chinese population. *Nutr Cancer* 2005;52:147–155.
22. Oz F. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography. *Food Chem* 2011;126:2010–2016.
23. Klassen RD, Lewis D, Lau BP-Y, Sen NP. Heterocyclic aromatic amines in cooked hamburgers and chicken obtained from local fast food outlets in the Ottawa region. *Food Res Int* 2002;35:837–847.
24. Warzecha L, Janoszka B, Blaszyk U, Strózyk M, Bodzek D, Anddobsz C. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. *J Chromatogr B* 2004;802:95–106.
25. Oz F, Kaban G, Kaya M. Heterocyclic aromatic amine contents of beef and lamb chops cooked by different methods to varying levels. *J. Anim. Vet. Adv* 2010;9(10):1436-1440.
26. Knize MG, Sinha R, Rothman N, Brown ED, Salmon CP, Levander OA, Cunningham PL, Felton JS. Heterocyclic amine content in fast- food meat products. *Food Chem Toxicol* 1995;33(7):545-551.
27. Abdulkarim BG, Scott SJ. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *J Agric Food Chem* 1998;46:4680-4687.
28. Rivera L, Curto MJC, Pais P, Galceran MT, Puignou L. Solid-phase extraction for the selective isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes and heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled meat. *J Chromatogr A* 1996;731: 85–94.
29. Polak T, Andrensek S, Zlender B, Gasperlin L. Effects of ageing and low internal temperature of grilling on the formation of heterocyclic amines in beef *Longissimus dorsi* muscle. *LWT – Food Sci Technol* 2009;42:256–264.
30. Murray S, Lynch AM, Knize MG, Gooderham NJ. Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl- and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography-negative ion mass spectrometry. *J Chromatogr* 1993;616:211–219.
31. Turesky RJ, Taylor J, Schnackenberg L, Freeman JP, Holland RD. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J Agric Food Chem* 2005;53:3248–3258.
32. Toribio F, Busquets R, Puignou L, Galceran MT. Heterocyclic amines in griddled beef steak analysed using a single extract clean-up procedure. *Food Chem Toxicol* 2007;45:667–675.
33. Grivas S. *Organic Synthesis of the Heterocyclic Amines*. Baffins Lane, Chichester, West Sussex, 373, England, 2000.
34. Knize MG, Andresen BD, Healy SK, Shen NH, Lewis PR, Bjeldanes LF, et al. Effects of temperature, patty thickness and fat content on the production of mutagens in fried ground beef. *Food Chem Toxicol* 1985;23:1035-1040.
35. Robbana-Barnat S, Rabache M, Rialland E, Fradin J. Heterocyclic amines: Occurrence and prevention in cooked food. *Environ Health Perspect* 1996;104:280–288.
36. Dundar A, Saricoban C, Yilmaz MT. Response surface optimization of effects of some processing variables on carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic

- amine (HAA) content in cooked patties. *Meat Science* 2012;91:325–333.
37. Johansson MAE, Jägerstad M. Influence of pro- and antioxidants on the formation of mutagenic-carcinogenic heterocyclic amines in a model system. *Food Chem* 1996;56:69–75.
38. Jägerstad M, Laser-Reuterswärd A, Olsson R, Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, et al. Creatin(ine) and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: Effects of various amino acids. *Food Chem* 1983;12:255–264.
39. Shin H-S, Park H, Park D. Influence of different oligosaccharides and inulin on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties. *J Agric Food Chem* 2003;51:6726-6730.