



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

**ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ SUCUKLARDA N-NİTROZAMİN OLUŞUMUNUN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Engin ELDİVENCİ

Birinci Danışman: Prof. Dr. Cemal KAYA

İkinci Danışman: Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ

TOKAT- 2025

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Cemal KAYA danışmanlığında hazırlamış olduğum “Isıl İşlem Görmüş Sucuklarda N-nitrozamin Oluşumunun Araştırılması” adlı doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

12/03/2025

Engin ELDİVENCİ



JÜRİ KABUL VE ONAY



ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince her anlamda yardımını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cemal KAYA ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ'ye, tezimin tüm süreçlerinde desteklerini sunan Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa BAYRAM ve Dr. Öğr. Üyesi İlker Turan AKOĞLU' na, tezin değerlendirilmesinde değerli katkılar sağlayan Doç.Dr.Mutlu ÇEVİK ve Dr.Öğr.Üyesi Esra ESİN'e, sucuk örneklerinin analize hazırlanmasında laboratuvar imkanlarını cömertçe sunan Düzen Norwest Çevre Laboratuvarı çalışanlarına, LC-MS/MS cihazı ile analizlerin yürütülmesindeki yardımları için Erzurum Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline, sucuk örneklerinin üretimi ve depolanmasındaki katkıları için Et ve Süt Kurumu Sincan Et Kombinası şarküteri bölümü çalışanlarına ve tüm bu süreç boyunca manevi desteklerini üzerimden esirgemeyen Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ SUCUKLARDA N-NİTROZAMİN OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

Eldivenci, Engin

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal KAYA

İkinci Danışman: Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ

Mart 2025, xi + 101 sayfa

Bu çalışma, muhtemel kanserojen olan 7 uçucu N-nitrozamin türünün, bu yönden riskli bir gıda olan ısıtılmış sucuk üretiminin başlangıcından tüketim zamanına kadarki tüm süreçlerde miktarlarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, katkı olarak ilave edilen askorbik asit miktarının ve uygulanan ısıtılmış işlem parametrelerinin tüm süreçlerdeki N-nitrozamin oluşumuna etkilerinin incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; üç farklı oranda askorbik asit (% 0.05 % 0.1 ve % 0.15) ilavesiyle sucuk hamuru hazırlanmıştır. Hazırlanan sucuk hamurları kılıflara doldurulduktan sonra fermentasyona tabi tutulmuş ve sonrasında örneklerin merkez sıcaklığı 57°C, 65°C ve 73°C olacak şekilde üç farklı sıcaklıkta ısıtılmış işlem uygulanmıştır. Olgunlaştırma işleminden sonra sucuklar 90 gün boyunca +4°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmanın üretim aşamaları ve depolamanın 30, 60 ve 90. günlerinde ve farklı 3 pişirme tekniği (kızartma, mikrodalga pişirme, ızgara) uygulanan sucuk örneklerinde, meydana gelen N-nitrozamin bileşikleri ve miktarları LC-MS-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Çalışmanın üretim sürecinin ilk iki aşaması olan fermentasyon ve ısıtılmış işlem sürecinde NPYR ve NDPA hariç tüm N-nitrozamin türevleri saptanırken, olgunlaşma aşamasını takiben yüksek seviyede NMEA (28.5 µg/kg), NPIP (4.3 µg/kg) ve NDMA (2.3 µg/kg) belirlenmiş ve diğer N-nitrozamin türevleri de oluşmaya başlamıştır. Yine bu aşamada ilave edilen askorbik asitin oranına bağlı olarak N-nitrozamin oluşumu önemli oranda azalmıştır. Uygulanan ısıtılmış işlem parametrelerinin N-nitrozamin oluşumu üzerine etkileri askorbik asite nazaran sınırlı kalmıştır. Raf ömrü boyunca muhafaza sürecinde ise, genel olarak zaman ilerledikçe uçucu N-nitrozamin türevlerinin miktarında artış olmuştur. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı tarafından en riskli N-nitrozamin türleri olarak gösterilen NDEA ve NDMA, düşük askorbik asit uygulanmış örneklerde 5 µg/kg seviyesine kadar yükselmiştir. Araştırmanın son aşamasında ise pişirme işlemleri değerlendirilmiş, üretim ve muhafaza verilerine kıyasla yüksek değerler elde edilmiştir. Mikrodalga ile sucuk pişirme düşük seviyelerde N-nitrozamin oluşumuna yol açarken,

özellikle kızartma ve ızgara işlemlerinde yüksek seviyelerde N-nitrozamin bileşikleri tespit edilmiştir. Çalışmanın tüm verilerine bakıldığında en düşük değer, % 0.15 askorbik asit ilaveli sucuk örneklerinde NPYR oranlarında görülmektedir (0.32 µg/kg) En yüksek N-nitrozamin miktarı ise yağda kızartılmış örneklerde 80 µg/kg NMEA olarak saptanmıştır. Sonuç olarak sucuk, üretiminden, tüketiminin son gününe kadar N-nitrozaminler yönünden risk taşımaktadır. Üretim esnasında askorbik asit miktarının artırılması N-nitrozamin seviyesinin her aşamada azalmasında etkili olmuştur. Tüketim süreçlerinde uygulanan pişirme yöntemi tercihleri de N-nitrozamin oluşumunu önemli ölçüde etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: Sucuk, N-nitrozamin, Et ürünleri, LC-MS/MS (Sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometrisi)

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FORMATION OF N-NITROSAMINES IN HEAT-TREATED SUCUK

Eldivenci, Engin

Doctorate Thesis, Department of Food Engineering

Advisor: Prof. Dr. Cemal KAYA

Second Advisor: Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ

March 2025, xi + 101 pages

This study was carried out to determine the amounts of seven volatile N-nitrosamine derivatives, which are probable carcinogens, in heat-treated sucuk (a kind of dried and cured sausage), a risky food in this respect, from the beginning of production to the time of consumption. The study also aimed to investigate the effects of the amount of ascorbic acid added as an additive and the applied heat treatment parameters on the formation of N-nitrosamine in all these processes. For this purpose; sausage dough with three different ascorbic acid contents of 0.05%, 0.1% and 0.15% were prepared. These prepared doughs were processed with three different heat treatment applications during the production process, with the central temperature of the samples being 57°C, 65°C and 73°C. Thus, according to the production stages (fermentation, heat treatment, maturation), storage process (Day 30. Day 60. Day 90.) and consumption preferences (frying, microwave cooking, grilling), N-nitrosamine compounds and their amounts formed in the sausage could be determined. N-nitrosamine analyses of the samples prepared for these purposes were performed with LC-MS/MS device. According to the results of the study, while all N-nitrosamine derivatives except for NPYR and NDPA, were detected in the first two stages of the production process, fermentation and heat treatment, high levels of NMEA (28.5 µg/kg), NPIP (4.3 µg/kg) and NDMA (2.3 µg/kg) were formed following the maturation stage, while other N-nitrosamine derivatives also started to form. Again, depending on the ratio of ascorbic acid added at this stage, N-nitrosamine formation was significantly suppressed. The effects of the applied heat treatment parameters on N-nitrosamine formation were limited compared to ascorbic acid. In the last stage of the study, cooking processes were evaluated and high values were obtained compared to production and storage data. Differences were also detected between the type of cooking method and N-nitrosamine formations. While cooking sausage with microwaves led to relatively low levels of N-nitrosamine formation, high levels of N-nitrosamine compounds were detected especially in frying and grilling processes. When all data of the

study are examined, the lowest value is seen in NPYR rates in sausage samples with 0.15% ascorbic acid addition (0.32 $\mu\text{g/kg}$). The highest N-nitrosamine rate was determined as 80 $\mu\text{g/kg}$ NMEA in fried samples. As a result, sausage carries a risk in terms of N-nitrosamines from its production to the last day of consumption. Increasing the amount of ascorbic acid during production was effective in reducing N-nitrosamine levels at every stage. Cooking method preferences during consumption processes also significantly affect the formation N-nitrosamine.

Keywords: Sausage, Nitrosamine, Meat products, LC-MS/MS (Liquid chromatography-mass/mass spectrometry)



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
SİMGELER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kuramsal Temeller.....	3
2.2.N-nitrozaminlerin Genel Yapısı	6
2.3.N-nitrozaminlerin Oluşumu	8
2.4. Et Ürünlerinde N-nitrozaminler ile İlgili Çalışmalara Ait Literatür Özeti.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2.Yöntem.....	20
3.2.1. Sucuk örneklerinin üretimi.....	20
3.2.1.1. Sucuk üretim aşamaları.....	22
3.2.1.1.1 Sucuk hamurunun hazırlanması.....	23
3.2.1.1.2. Sucuk Hamurunun kılıflara dolumu.....	23
3.2.1.1.3. Fermantasyon aşaması.....	24
3.2.1.1.4. Isıl işlem aşaması.....	24
3.2.1.1.5. Olgunlaştırma aşaması.....	25
3.2.1.1.6. Ambalajlama aşaması.....	25
3.2.2. Pişirme işlemleri.....	26
3.2.3. Numune hazırlama metodu.....	27
3.2.4. N-nitrozaminlerin tayini.....	29
3.2.5. Geri kazanım çalışması.....	31
3.2.6. Tekrarlanabilirlik LOD ve LOQ değerleri.....	31
3.2.7. Bazı fizikokimyasal analizler	32
3.2.8. İstatistiksel analizler.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Sucukların pH Değeri, Nem, Protein ve Yağ Miktarı	34
4.2. Nitrat-Nitrit Miktarı.....	34
4.3. Nitrozodimetilamin Miktarı.....	35
4.4. Nitrozopiperidin Miktarı.....	40
4.5. Nitrozopirolidin Miktarı.....	45
4.6. Nitrozodietilamin Miktarı.....	50
4.7. Nitrozodibütilamin Miktarı.....	54
4.8. Nitrozodipropilamin Miktarı.....	58
4.9. Nitrozodimetiletılamin Miktarı.....	63
4.10. Pişirme Uygulamaları Sonuçları.....	67

4.11. Tartışma.....	68
5. SONUÇLAR.....	71
6. KAYNAKLAR.....	74
7.EKLER.....	80
7.1. EPA 521 N-nitrozamin Standardına ait LC-MS/MS kromotogramı.....	80
7.2. N-nitrozamin türevlerine ait kalibrasyon eğrileri.....	80
7.3. Spike Numunelerine Ait Kromotogramlar.....	83
% 0.05 Askorbik Asit İlaveli Örneklerle Ait Analiz Sonuç Kromotogramları....	84
% 0.1 Askorbik Asit İlaveli Örneklerle Ait Analiz Sonuç Kromotogramları.....	92
% 0.15 Askorbik Asit İlaveli Örneklerle Ait Analiz Sonuç Kromotogramları	98
8. ÖZGEÇMİŞ.....	101



SİMGELER ve KISALTMALAR

Ø	: Çap
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
CO ₂	: Karbondioksit
DCIM	: Diklorometan
dk	: Dakika
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
Kg	: Kilogram
LD	: Öldürücü Doz
LOD	: Tayin Limiti
LOQ	: Ölçüm Limiti
L	: Litre
µg	: Mikrogram
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
N ₂	: Azot
NO	: Nitrit Oksit
NO ₂	: Nitrit
NO ₃	: Nitrat
NOMb	: Nitrit-Oksit Miyoglobini
NDBA	: N-Nitrosodi-n-Butylamine
NDEA	: N-Nitrosodiethylamine
NDMA	: N-Nitrosodimethylamine
NDPA	: N- Nitrosodi-n-Propylamine
NDPHA	: N-Nitrosodiphenylamine
NMEA	: N-Nitrosomethylethylamine
NMOR	: N-Nitrosomorpholine
NPIP	: N-Nitrosopiperidine
NPYR	: N-Nitrosopyrrolidine
ppm	: Mg/Kg
µg/kg	: µg/Kg
rpm	: Revolutions Per Minute
R _t	: Alınma Zamanı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Yy	: Yüzyıl
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1. Et ve et ürünlerinde karakteristik renk oluşum reaksiyonları.....	4
Şekil 2.2. N-nitrozamin ve nitrozamidlerin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Et ürünlerinde araştırmalara en çok konu olan önemli N-nitrozaminler.	7
Şekil 2.4. Genel N-nitrozamin oluşum reaksiyonu.....	8
Şekil 2.5. N-nitrozamin oluşum tepkimeleri.....	10
Şekil 3.1. Sucuk üretimi aşamaları	22
Şekil 3.2. Sucuk hamurunun hazırlanması.....	23
Şekil 3.3. Sucuk hamurunun kılıflara dolumu	23
Şekil 3.4. Fermantasyon aşaması	24
Şekil 3.5. Isıl işlem aşaması.....	24
Şekil 3.6. Olgunlaşma aşaması	25
Şekil 3.7. Ambalajlama aşaması	25
Şekil 3.8. Pişirme işlemleri	26
Şekil 3.9. Örneklerin parçalanması.....	27
Şekil 3.10.Ultrasonik su banyosu	27
Şekil 3.11. Süzüntü toplama	28
Şekil 3.12. Rotary evaporatör	28
Şekil 3.13. Analize hazırlanmış örnekler.....	29
Şekil 3.14. LC-MS/MS Cihazı.....	29
Şekil 3.15. Foss Foodscan Lab Cihazı	33
Şekil 4.1. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodimetilamin oluşumu üzerine etkileri	37
Şekil 4.2. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodipiperidin oluşumu üzerine etkileri	42
Şekil 4.3. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodipirolidin oluşumu üzerine etkileri	47
Şekil 4.4. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodietilamin oluşumu üzerine etkileri	52
Şekil 4.5. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodibütülinamin oluşumu üzerine etkileri	57
Şekil 4.6. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve	

depolama süresince nitrozodipropilamin oluşumu üzerine etkileri	61
Şekil 4.7. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince nitrozodimetiletilamin oluşumu üzerine etkileri.....	66



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli et ürünlerinde n-nitrozamin içerikleri.	9
Çizelge 3.1. Sucuk hamuru bileşenleri	21
Çizelge 3.2. LC-MS/MS koşulları	30
Çizelge 3.3. LC-MS/MS gradient sistem çözücü konsantrasyonları	30
Çizelge 3.4. N-nitrozaminler için geri kazanım değerleri	31
Çizelge 3.5. Analiz metoduna ait sayısal değerler	32
Çizelge 4.1. Sucukların bazı fizikokimyasal özellikleri	34
Çizelge 4.2. Nitrat ve nitrit miktarları	34
Çizelge 4.3. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDMA miktarı	36
Çizelge 4.4. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NPIP miktarı	41
Çizelge 4.5. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NPYR miktarı	46
Çizelge 4.6. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDEA miktarı	51
Çizelge 4.7. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDBA miktarı	56
Çizelge 4.8. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDPA miktarı	60
Çizelge 4.9. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NMEA miktarı	64
Çizelge 4.10. Farklı yöntemlerle pişirilen sucuklardaki N-nitrozamin miktarları....	67

1. GİRİŞ

Et ve et ürünleri, sağlıklı ve dengeli beslenmenin en önemli unsurlarından biridir. Aynı zamanda et ve et ürünleri, yüksek biyolojik değerli proteinlerin, B grubu vitaminlerin, minerallerin ve farklı biyoaktif bileşiklerin kaynağıdır. Et ürünleri içerisinde kürlenmiş, ısıtılmış işlem görmüş ya da emülsifiye et ürünleri, tüketici tercihlerine bağlı olarak gıda sektöründe önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle kürlenmiş et ürünlerinden sucuk, lezzetli ve pratik bir et ürünü olarak ülkemizde ve dünyada rağbet görmektedir.

Et ve et ürünleri, yüksek su aktivitesi ve besin değerinden dolayı kolay bozulabilir bir yapıya sahiptir. Hem endüstriyel hem de küçük ölçekte et ürünlerinin işlenmesi ve muhafazasında; soğutma, dondurma, kurutma, kürlenme, tuzlama, tütsüleme, pastörizasyon, sterilizasyon gibi teknikler uygulanmaktadır. Ayrıca son yıllarda iyonize radyasyon, vurgulu elektriksel alan, yüksek hidrostatik basınç, ultrason, ultraviyole, gibi yeni gıda işleme teknikleri de et endüstrisinde yer bulmaya başlamıştır. Etin muhafazasında ve işlenmesinde tek bir yöntem kullanılabildiği gibi birçok yöntem beraber de uygulanabilmektedir (Zhou ve ark., 2010; Turantaş ve ark., 2015).

Kürleme, eski çağlardan beri et muhafazasında kullanılmakta olan bir yöntem olup nitratın tuz ile beraber koruyucu etkiyi artırıp aynı zamanda kırmızı renk oluşumu da sağladığı 19. yüzyılda fark edilmiştir (Polenske, 1891; Marco ve ark., 2006). Et ürünlerinin beslenme yönünden olumlu yönleri kadar; uygulama, işleme yöntemleri ve kullanılan katkılara bağlı olarak insan sağlığı açısından olumsuz yönleri de bulunabilmektedir. Özellikle işlenmiş ve ısıtılmış işlem görmüş et ürünlerinde kullanılan nitrit-nitrat kürleme tuzlarının neden olabileceği bazı zararlı maddelerin oluşumu bu bağlamda önemlidir ve dikkatle incelenmelidir (Özbay, 2022)

Et ürünlerinde N-nitrozaminler, nitrit ve nitrat içeren bileşiklerle amin gruplarının tepkimesi sonucu meydana gelebilmektedir. Bu süreci etkileyen üretim ve pişirme Şekilleri doğru uygulandığında N-nitrozamin oluşumu sınırlı kalırken, bazı durumlarda ise sağlık yönünden risk oluşturacak seviyelerde N-nitrozamin oluşabilmektedir. Et ürünlerinde N-nitrozaminler ile ilgili literatür incelendiğinde, üretim aşamalarını N-nitrozamin oluşumu açısından inceleyen çalışmaların yeterli sayıda olmadığı anlaşılmıştır.

Isıl işlem görmüş sucuklarda; farklı oranlarda askorbik asit ilavesi, ısıl işlem sıcaklık dereceleri, depolama süreleri ve pişirme yöntemlerinin bir bütün olarak N-nitrozamin oluşumuna etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında hava, su, toprak, gıda gibi ortamlarda 200'den fazla çeşiti bulunabilen N-nitrozaminlerden özellikle Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından muhtemel kanserojen etkileri olduğu kabul edilen, yedi farklı N-nitrozamin üzerinde çalışılmıştır. Bu N-nitrozaminler; N-nitrosodimetilamin (NDMA), N-nitrosodietilamin (NDEA), N-nitrosodibütilamin (NDBA), N-nitrosopiperidine (NPIP), N-nitrosopirrolidine (NPYR), N-nitrosodipropilamin (NDPA) ve N-nitrosometileilamine (NMEA) olup 3 farklı oranda askorbik asit ilave edilerek üretilen sucuk numunelerinde; ısıl işlem, olgunlaştırma, depolama ve pişirme aşamalarında oluşabilen N-nitrozaminlerin analizleri LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi) cihazı ile yapılmıştır.

Bu doktora tez çalışmasının temel amacı, ülkemizde yaygın olarak tüketilen, dünyada ise kürlenmiş fermente et ürünleri gibi farklı çeşitleri olan sucuğun N-nitrozaminlerin oluşumu açısından bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, sucuğun üretimi sırasında farklı oranlarda askorbik asit ilavesi ve farklı ısıl işlem parametrelerinin; fermentasyon, olgunlaştırma, depolama ve pişirme aşamalarında N-nitrozamin oluşumuna etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

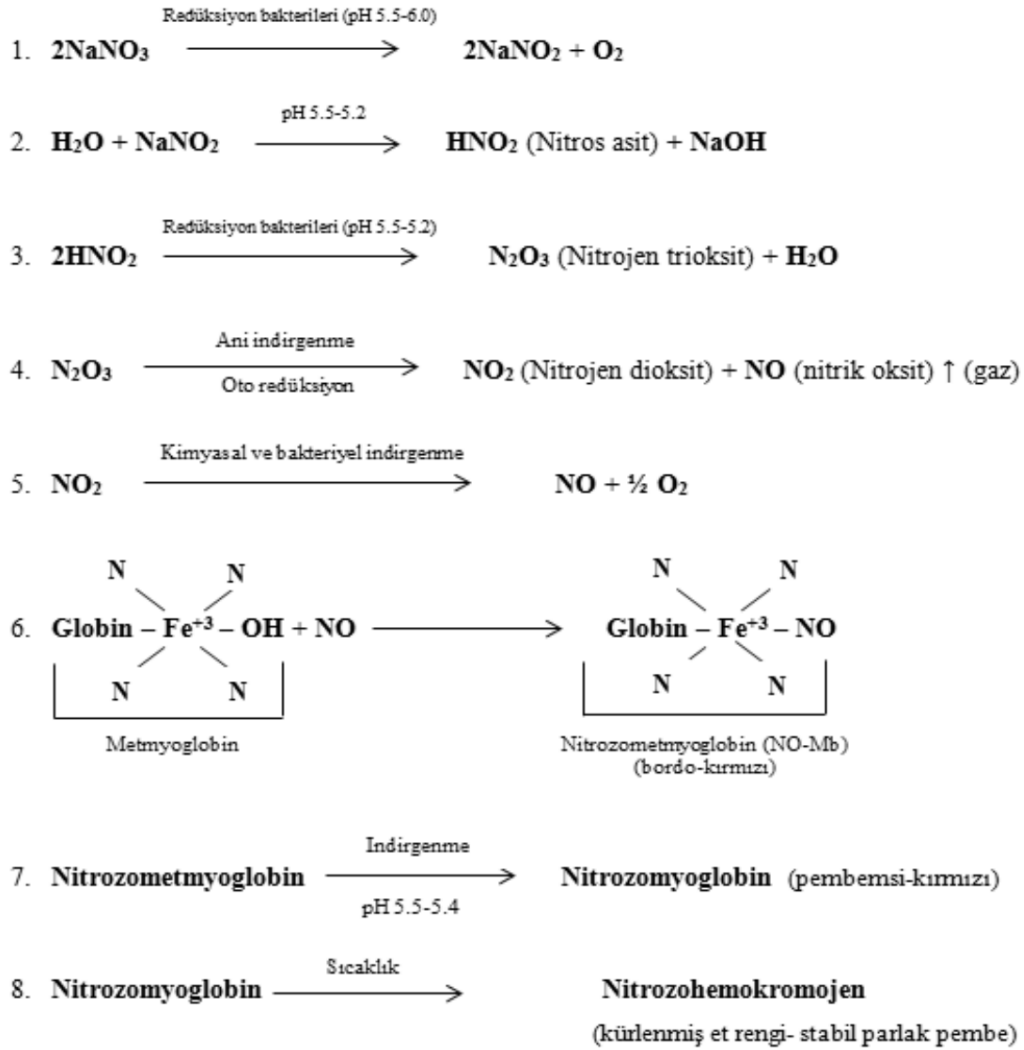
2.1. Kuramsal Temeller

Tüm gıda maddelerinde olduğu gibi et ürünlerinde de mikrobiyal yönden güvenli son ürün eldesi çok önemlidir. Bu amaçla en çok tercih edilen tekniklerin başında ısıtım işlemi gelmektedir. Isıtım işlemi ile hedef alınan mikroorganizmalardan spor oluşturmıyan bakterilerin inhibisyonu için pastörizasyon işlemi yeterli gelmekte iken, pH'sı 4.5'in üzerinde olan gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterileri inhibe etmek için sterilizasyon işlemi elzemdir. Konserve et ürünlerinde ısıtım sterilizasyon işlemi otoklav ile mümkün iken, geleneksel usullerle kılıflara dolum yapılarak üretilen sucuk, salam ve sosis gibi et ürünlerinde bu işlem teknik olarak mümkün değildir ve bu nedenle çeşitli katkı maddelerinin kullanımı zorunludur. Sucuk ve sosis üretim teknolojisinde ilk akla gelen katkı maddeleri ise nitrit ve nitratlardır (Sırıken ve ark., 2006). Nitrit ve nitrat tuzları et ürünlerinde; koruyucu özelliğinin yanında, renk oluştıurucu, tipik kür edilmiş et aroması oluşumu ve antioksidan etkilerinden dolayı da kullanım alanı bulmuşlardır (Rincon ve ark., 2003; Marco ve ark., 2008).

Nitrit, bakteristatik ve bakteriosidal ajan olarak kür edilmiş et ürünlerinde önemli rol oynamaktadır (Sebranek ve Bacus, 2007). Nitrit, aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların çoğı üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir. Nitrit, özellikle *C.botulinum* başta olmak üzere, *B. cereus*, *S. aureus*, *C. perfringens* gibi diğır bazı gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini de kontrol altına alabilmektedir (Gökalp, 1983; Parthasarathy ve Bryan, 2012). Nitritin antimikrobiyal etki mekanizması, disosiye olmamış nitroz asidin (HNO_2), bakteriyel hücre duvarının iyon bariyerini geçmesi ve bakteriyel enzimlerin fonksiyonlarını bozarak gelişimini engellemesi ile gerçekleşmektedir (Kaya ve Kaban, 2016).

Et ürünlerinde renk, renk pigmentleri ile kürlleme ajanlarının tepkimesi sonucu oluşmaktadır. Taze ette en önemli renk pigmeti myoglobindir. Kürlleme prosesinde, myoglobin, nitrat ve nitrit tuzlarının parçalanma ürünü olan nitrik oksit ile birleşerek renk oluşumunda temel bileşen olan nitrozomyoglobini oluşturmaktadır. Nitrozomyoglobin (nitrozilmyoglobin), fermente sucuk, pastırma gibi ısıtım işlemi uygulanmayan et ürünlerinde oluşan tipik renk maddesidir. Nitrozomyoglobinin denatürasyonu sonucu oluşan nitrozohemokrom (nitrozilhemekrom) ise sosis ve salam gibi ısıtım işlemi uygulanmış emülsüfiye et ürünlerinin rengini oluşturmaktadır

(Öztan ve ark.,1991; Honikel, 2008; Suman ve Joseph, 2013). Şekil 2.1’de et ürünlerinde karakteristik rengi oluşum reaksiyonları görülmektedir.



Şekil 2.1 Et ve et ürünlerinde karakteristik kür rengi oluşum reaksiyonları (Gökalp ve ark., 2002; Honikel, 2008;)

Nitrat ve/veya nitrit tuzları antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antioksidan olarak da etkili olmaktadır (Hammes, 2012). Ancak nitratın belirtilen bu etkileri gösterebilmesi için önce nitrite indirgenmesi gerekmektedir (Kaya ve Kaban, 2016). Bununla birlikte nitrat ve nitrit kür edilmiş et ürünlerinde kanserojenik bileşikler olan N-nitrozaminlerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Cassens, 1997; Hammes, 2012).

Kürleme ajanı olarak formülasyona ilave edilen nitrit ve nitratın N-nitrozamin oluşumundaki önemli rollerinden dolayı kullanım miktarları pek çok ülkede yasal mevzuatlarla sınırlandırılmıştır. Ülkemizde 2013 yılında Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde fermente sucukta nitrat kullanımı yasaklanmış ve sadece nitrit kullanımına müsaade edilmiştir (Anonim, 2013). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde yapılan değişiklik ile fermentasyonun ardından en az 3 hafta olgunlaştırılmak şartı ile bu üründe nitrat tuzu kullanımına izin verilmiştir. Buna göre sucukta nitrit ve nitrat için kullanılacak maksimum değer 150 mg/kg'dır (Anonim, 2023).

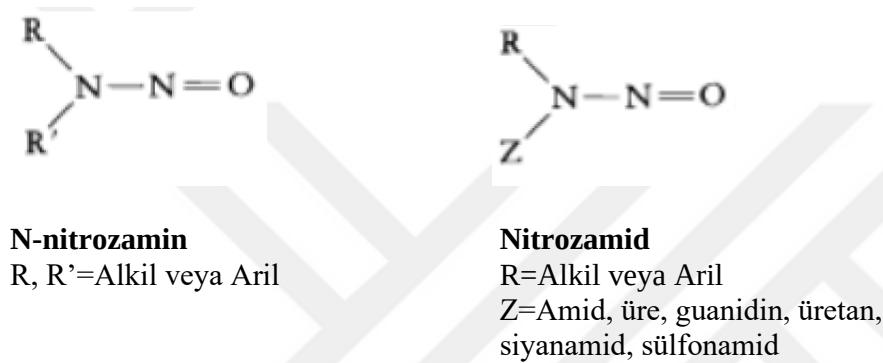
Et ürünlerinde nitrat ve nitritin yerini alabilecek pek çok bileşik araştırılmış ancak bugüne kadar bu bileşiklerin fonksiyonlarını yerine getirebilecek bir madde bulunamamıştır (Gökalp, 1983; Krause ve ark., 2011). Nitrit ve dolayısıyla nitratın ürünün kalitesi ve güvenliği üzerinde pek çok olumlu etkisi olmasına rağmen, et ürünlerinde düşük miktarda nitrat ve nitritin kullanılması üründe renk sorunlarına ve mikrobiyal bozulmalara sebep olmakta, fazla miktarda olması da kalıntı nitrit miktarının artmasına ve N-nitrozaminlerin oluşumuna neden olmaktadır (Öztaş ve ark., 1991; Hammes, 2012).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2015 yılında işlenmiş et ürünlerinin tüketimine dikkat edilmesine dair açıklamalarda bulunmuş ve dikkatleri et ürünlerinde oluşabilen kanserojen N-nitrozamin türevlerine çekmiştir (Anonim, 2015).

N-nitrozaminlerin toksikolojik özelliklerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Deney fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kilogram başına 50 mg NDMA içeren diyetle beslenen farelerin tamamına yakınında tehlikeli tümör olduğu görülmüştür (Magee ve Barnes ,1956). Başka bir çalışmada ise nitrit ilaveli balıklar ile beslenen bazı hayvanlarda NDMA'nın karaciğer fonksiyon bozukluklarına yol açtığı bildirilmiştir (Ender ve ark., 1964).

2.2. N-nitrozaminlerin Genel Yapısı

Nitrozobileşikler, N-nitrozamin ve nitrozamid şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Bu bileşikler kimyasal stabilitesi ve biyolojik etkinliklerine göre farklı özelliklere sahiptir (Reinik, 2007). N-nitrozaminler radikal gruplarında alkil veya aril içerirken, nitrozamidler radikal grubun birinde alkil veya aril, diğer radikal grupta ise amid, üre, guanidin, üretan, siyanamid veya sülfonamid içermektedir (Douglass ve ark., 1978).



Şekil 2.2 N-nitrozamin ve nitrozamidlerin kimyasal yapısı

N-nitrozaminler yapı olarak $R_1R_2N-N=O$ fonksiyonel grubunu içeren amin bileşikler olarak tanımlanmaktadır. N-nitrozamin ve türevleri, Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı tarafından insanlar için kanserojen olarak bildirilmiştir (IARC, 1987).

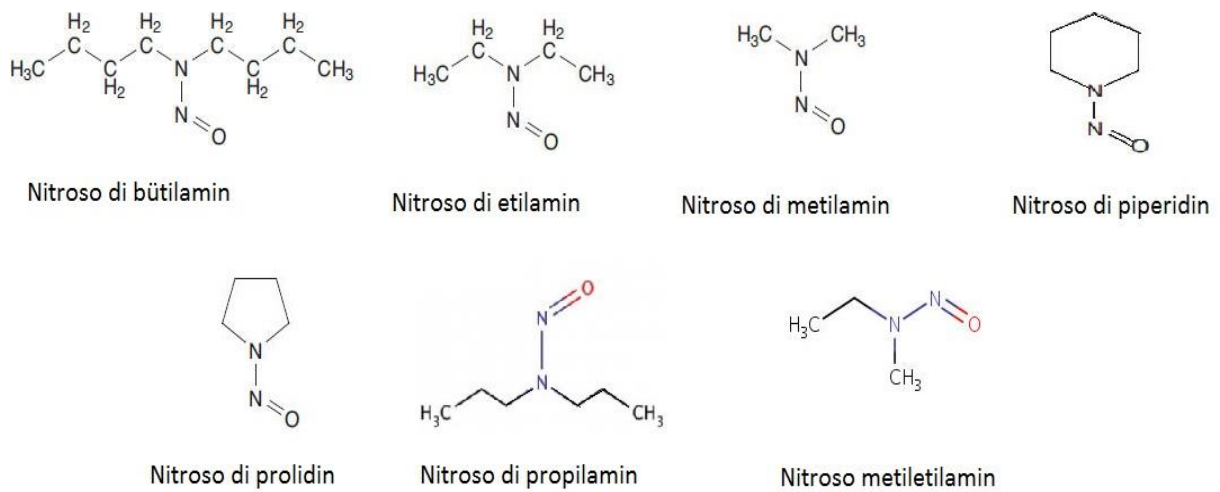
N-nitrozaminler karsinojenik, mutajenik ve teratojenik özelliğe sahip N-nitrozo bileşiklerdir (Rywotycki ve ark. 1998; Ventanas ve ark. 2006; Ata, 2010). N-nitrozaminler kararlı bileşikler olup kanserojenik veya mutajenik aktivite gösterebilmeleri için enzimatik bir reaksiyonla kimyasal modifikasyona uğramaları gerekmektedir (Douglass ve ark., 1978).

N-nitrozaminlerin, uçucu ve uçucu olmayan olmak üzere iki kategorisi vardır. Çalışmamıza da konu olan uçucu N-nitrozaminler arasında N-nitrosodimetilamin, N-nitrosodietilamin, N-nitrosopirrolidin, N-nitrosopiperidin, N-nitrosodipropylamine, N-nitrosodibutylamine insan sağlığına olası zararları yönünden dikkat çekicidir ve et ürünlerinde sıklıkla çalışılmaktadır (Scanlan, 1983).

N-nitrozaminlerin çoğu güçlü mutajenik etkilidir ve bunların alınması vücutta tümörlere yol açabilir (Lijinsky, 1999). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, epidemiyolojik araştırmalara ve hayvan deneylerinin kanıtlarına dayanarak, N-nitrosodimetilamin ve N-nitrosodietilamin'in insanlar için muhtemelen kanserojen olduğunu kabul etmiştir. Et ürünlerinde yaygın olarak bulunan diğer N-nitrozaminler, örneğin, N-nitrosodibütilamin, N-nitrosopiperidin ve N-nitrosopirolidin, insanlar için potansiyel kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1987).

Yuan ve ark., (2015) tarafından; N-nitrosodimetilamine, N-nitrosodietilamine N-nitrosodibütilamine, N-nitrosopiperidine ve N-nitrosopirolidine özellikle kanserojen ve muhtemel kanserojen uçucu N-nitrozaminler olarak sınıflandırılmıştır. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) ise bu N-nitrozaminlere ek olarak N-nitrosodipropylamine (NDPA) ve N-nitrosomethylethylamine (NMEA) çeşitlerini de incelemiş, özellikle NDMA ve NDEA türlerinin kanserojen etkili olabileceğini bildirmiştir (Anonim, 2011).

N-nitrozaminlerin sağlığa etkileri açısından alımı ve alım dozları büyük önem taşımaktadır. Çünkü alımlarıyla oluşabilecek en önemli risk, karsinojenik etkilerinden ileri gelmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), NDMA ve NDEA'ı insanlar için en yüksek düzeyde kanserojenik N-nitrozaminler; NDBA, NPIP ve NPYR'i ise kanserojen ihtimali yüksek N-nitrozaminler olarak sınıflamıştır (IARC, 1987). Söz konusu bu N-nitrozaminlerin kimyasal yapısı Şekil 2.3'de görülmektedir.

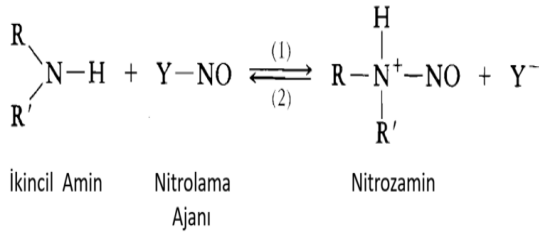


Şekil 2.3. Et ürünlerinde araştırmalara en çok konu olan önemli N-nitrozaminler.

2.3. N-nitrozaminlerin Oluşumu

İşlenmiş et ürünlerinde N-nitrozamin konusu büyük önem taşımaktadır ve kullanılan hammaddeden, raf ömrü bitimine kadar, N-nitrozamin oluşumları ve düzeyleri bu süreçteki tüm faktörlerden etkilenmektedir. Isıl işlem uygulama parametreleri büyük oranda süreç üzerinde etkili olmakla birlikte, N-nitrozamin oluşumu için, nitrat, nitrit, birincil, ikincil ve üçüncül aminler, amidler, proteinler, peptitler, aminoasitler, farklı öncül maddeler ve mikrobiyal aktivite de N-nitrozamin oluşumu üzerine etkilidir (Yurchenko ve Mölder, 2007).

N-nitrozaminler, nitrozasyon ajanı (Y-NO) tarafından sağlanan nitrozonyum katyonu (NO⁺) ile amin azotu arasında elektrofilik substitüsyon reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Şekil 2.4) (De Mey ve ark., 2014a).



Şekil 2.4. Genel N-nitrozamin oluşum reaksiyonu

Sekonder aminler ya da amidler Şekil 2.4’de görüldüğü gibi, nitrozlama ajanı ile reaksiyona girerek, R₁R₂N-N=O fonksiyonel grubuna sahip N-nitrozamin oluşumu gerçekleştirmektedir. Şekilde görülen Y-NO nitrolama ajanıdır ve Y maddesinin doğasına bağlı olarak nitrolama ajanının etkinliği değişmekte buna bağlı olarak N-nitrozamin oluşumu artıp azalabilmektedir (Douglass ve ark., 1978).

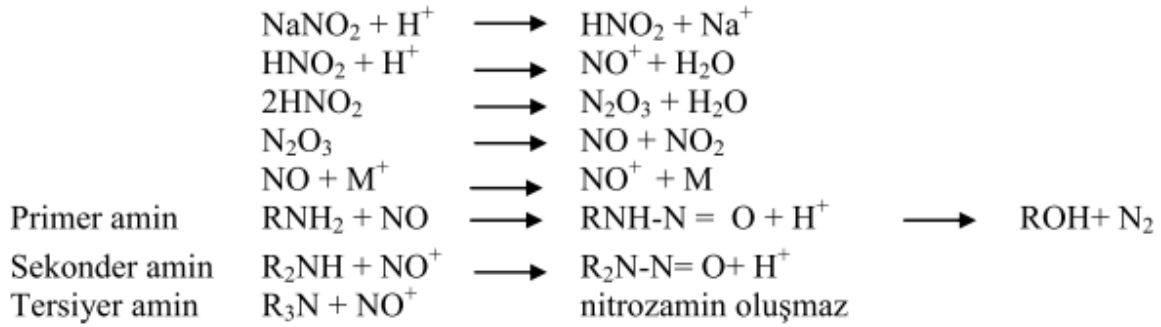
N-nitrozaminler bu mekanizma ile gıdada veya midede oluşabilmekte ve oluşumlarında pişirme süresi ve yönteminin yanı sıra mikrobiyal flora, ortam sıcaklığı, ortamdaki nitrit miktarı, tuz konsantrasyonu ve pH gibi faktörler etkili olmaktadır. Ayrıca, N-nitrozamin oluşumu, ortamdaki aminlerin yapısına, reaktiflerin ve bazı inorganik iyonların konsantrasyonuna ve nitrit/amin oranına bağlı olarak da değişebilmektedir (Özçelik, 1982; Gençcelep, 2010).

Yapılan araştırmalar, kürlenmiş veya emülsifiye et ürünlerinin farklı pişirme yöntemleri uygulaması sonrasında N-nitrozaminler açısından riskli olabileceğini bildirmektedir. Çizelge 2.1’de bazı et ürünlerinde güncel literatür taraması ile elde edilen N-nitrozamin değerleri görülmektedir.

Çizelge 2.1. Çeşitli Et rnlerinde N-nitrozamin İçerikleri (Yingfeng ve ark., 2023; Lee, 2019).

Et rn	Ortalama miktar (µg/kg)							
	NDMA	NPYR	NPIP	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NMOR
Geleneksel Çin Fermente Balık	3.76	1.36	3.38	0.59	-	-	-	1.14
Türk Sucuğu	0.3	0.6	1.1	-	0.3	0.5	0.4	-
Tütsülenmiş Krlenmiş Domuz Salamı	1.8	5.2	-	-	0.3	-	-	1.1
Kurutulmuş Salam	2	1.5	0.6	-	1	-	-	-
Danimarka Sosisi	1	1.4	-	-	0.1	-	-	-
Belçika Domuz Salamı	1.6	2.2	0.2	-	-	-	-	-
Çin Bacon	0.57	0.03	0.33	0.37	0.74	-	-	-
Çin Sosis	4	2.5	4.5	-	0.36	-	-	-
Kanatlı Eti (Pişirilmiş)	1.1	6	1.3	-	0.3	-	0.2	-
Kanatlı Eti (Kızartılmış)	1.3	18.8	1.1	-	0.8	-	0.4	-
Sosis (mangal veya yağda pişirilmiş)	0.3	0.4	0.2	-	1.1	-	0.2	-
Sosis	0.7	0.6	0.4	-	0.4	0.2	0.2	-

N-nitrozaminler yüksek sıcaklığın olduğu şartlarda nitrit ile aminlerin tepkimesi sonucunda oluşmaktadır. N-nitrozamin oluşumu için gerekli koşullardan biri ortamda amin varlığıdır. Taze ette amin miktarları oldukça düşük olup, olgunlaşma ve fermentasyon aşamalarında artmaktadır. Yalnızca ikincil aminler kararlı N-nitrozamin bileşikleri oluştırmakta, birincil aminler ise hızlı bir şekilde alkol ve azota yıkılmaktadır (şekil 2.5). Üçüncül aminler ise reaksiyona girmemektedirler. Bu koşullara ilave olarak, azot monoksit iyonu (NO⁺) oluştırmak için pH değeri yeterince düşük olmalı veya metal iyonları tutulmalıdır (Honikel, 2008)



Şekil 2.5 N-nitrozamin oluşum tepkimeleri (M/M^+ ; $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ gibi geçiş metal iyonlarını temsil etmektedir) (Honikel, 2008)

Dimetilamin (DMA) gibi sekonder aminlerin ortamdaki varlığının, N-nitrozamin oluşumunu etkilediği bildirilmektedir. Putresin ve kadaverin gibi birincil biyojen aminler ise, nitritle reaksiyona girerek N-nitrozamini oluşturan piperidin ve pirrolidin gibi sekonder aminlerin oluşumunu artırarak dolaylı olarak N-nitrozamin oluşumuna sebep olmaktadır (Warthesen ve ark., 1975).

Reaksiyon öncül maddelerinin yanı sıra N-nitrozamin oluşumunda sıcaklık, süre, pH gibi faktörler de etkili olmaktadır. Fermantasyon, ısıtma işlemi, olgunlaştırma gibi proseslerin, üretim sırasında N-nitrozamin oluşumunu teşvik edici koşullar sağladığı belirtilmektedir (De Mey ve ark., 2014a). Ayrıca, askorbik asit ve tuzları ile tokoferolün N-nitrozamin oluşumunu engellediği, tiyosiyanat iyonunun ise teşvik ettiği bildirilmiştir (Pirinççi ve ark., 1986).

Nitrit ve nitrat tuzları (kürleme yoluyla) ve uçucu haldeki nitrojen oksitler (tütsüleme yoluyla), nitrozlama ajanlarının ana kaynağıdır (Hotchkiss, 1987). Bu nitrozlama ajanları, ikincil ve üçüncül aminler ile tepkimeye girer ve N-nitrozamin oluşumunu teşvik eder.

İkincil aminler, gıda ürünlerine farklı yollardan dahil olabilirler. Et ürünlerinde, biyojen aminler ve diğer protein bozunma ürünleri, amin öncüllerinin önemli kaynakları olarak kabul edilmektedirler ve mikroorganizmaların nitratları nitritlere indirgeyebildiği ve aminler ve amino asitlere yıkılmak üzere proteinleri parçalamaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Tricker ve Preussmann, 1991).

NDEA ve NDBA'nın oluşumu genellikle amin öncüllerinin ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sen ve Ark.,1976; Domanska ve Kowalskg, 2002).

N-nitrozamin, gıda ürünlerinde oluşabileceği gibi nitrat veya nitritin gıdalardan alınması ile insan vücudunda da oluşabilmektedir. N-nitrozamin oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; et ürününe ilave edilen nitrit miktarı, etin kalitesi, yağ içeriği, diğer bileşenler, kurutma ve dumanlama süresince uygulanan ısı işlem, olgunlaştırma ve depolama koşulları, ambalajlama şeklinde sıralanabilir (Herrmann, 2014).

Ayrıca bakteriler, sıcaklık (100-185 °C) ve pH değeri (3-7) de N-nitrozamin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Söz konusu etki; nitratin nitrite dönüşümü, protein degradasyonu, aminoasit ve amin oluşumu, nitrozasyon için uygun pH oluşumu gibi faktörlerle ortaya çıkmaktadır (Drabik-Mariewicz ve ark., 2010). Uygun fizyolojik şartlarda, kimyasal reaksiyon veya mikrobiyal faaliyetlerle midede N-nitrozamin oluşumunun gerçekleşebildiği belirtilmiştir (Hofmann, 1979; Özçelik, 1982).

Ortamda bulunan iyon ve diğer bileşiklerin de N-nitrozamin oluşumunda etkisi bulunmaktadır. Örneğin, tiyosiyanat iyonu bu oluşumu hızlandırırken, askorbik asidin engellediği ayrıca tokoferol, laktik asit ve eritorbatın da azalttığı bildirilmiştir (Yıldırım, 1979; Bayraktar ve ark., 1998).

Et ürünlerine tat ve aroma kazandırmak amacıyla katılan bazı baharatların N-nitrozamin oluşumundaki etkisi bilinmektedir. Örneğin karabiberde bulunan piperin ve piperidin nitrozopiperidin (NPIP) oluşumunu teşvik etmektedir. Paprikada bulunan prolidin ise nitrozopirolidin oluşumunda etkilidir (De Mey ve ark., 2014b).

Balık, et ve sebze ürünlerinde; agmatin, spermin ve spermidin gibi biyogen aminlerin nitrozlama reaksiyonları sonucunda kanserojen N-nitrozamin bileşiklerinin oluşabildiği belirtilmektedir. Putresin ve kadaverin gibi sekonder aminlerin, nitrit ve yüksek ısı etkisiyle halka kapanmasına uğrayarak sırasıyla pirolidin ve piperidine dönüştüğü, bununla beraber söz konusu bu aminlerin gıda veya ilaçlar ile vücuda alındıklarında ise, midenin asidik ortamında nitrit ile reaksiyona

girerek sırasıyla N-nitrozopirrolidin ve N-nitrozopiperidin gibi kanserojen N-nitrozaminlere dönüştüğü belirtilmektedir (Akan ve Demirağ, 2018).

Ülkemizde yaygın olarak üretimi yapılan ısıt işlem görmüş sucuk, genellikle ızgarada pişirilerek ve yağda kızartılarak tüketilmektedir. Bu pişirme yöntemleri sonucu oluşan aromatik bileşikler tüketicilerin damak zevkine daha çok hitap etmektedir. Ancak, yüksek sıcaklıklar uygulandığında aroma üzerinde etkili olan bileşiklerin bazıları insan sağlığına olumsuz etkiler gösterebileceği gibi N-nitrozaminler başta olmak üzere pek çok karsinogenik bileşiğin de oluşumuna yol açabilmektedir. Diğer taraftan sucuk üretiminde genellikle düşük değerli, parçalamadan arta kalan kırpıntı ve trimming artığı etler kullanılmakta ve bu etler de N-nitrozamin oluşumunu teşvik eden amin açısından zengin bir kaynak olabilmektedir. Izgara ve kızartma gibi çeşitli pişirme yöntemleri kullanılarak hazırlanan et ürünlerinde, uygulanan ısıt işlem dereceleri ve süreleri N-nitrozamin oluşumu açısından önemli faktörlerdir. N-nitrozaminlerin, sıcaklık ve süre arttıkça miktarlarının arttığı ve bu parametrelerin N-nitrozamin oluşumunda çok önemli faktörler olduğu belirtilmektedir (Rywotycki, 2002). Ayrıca, nitrit miktarı ve depolama koşullarının da N-nitrozamin oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (Özdemir ve ark., 1984; Yurchenko ve Mölder 2007).

Et ürünlerinde biyojen aminler, aminoasitlerin dekarboksilasyona uğraması veya aldehit ve ketonların transaminasyon veya aminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir (Çolak ve Aksu 2002; Alper ve Temiz 2001). Fermente sucuklarda olgunlaştırma aşamasında dekarboksilaz enzimi üreten mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyojen aminler, sekonder aminlerin kaynağı olabilmektedir (De Mey ve ark., 2014b). Isıt işlem görmüş sucuklarda değeri düşük kıymalık etlerin kullanılması ve ayrıca fermentasyon sırasında proteolizis ile oluşan sekonder aminlerin N-nitrozamin oluşumunu artırabileceği bildirilmiştir (Jıra, 2004).

Kurt ve Zorba (2009) tarafından, putresin ve kadaverinin nitritle tepkimesi sonucu N-nitrozamin oluştuğu, putresin, spermidin ve sperminin ise NPYR öncül maddesi olabileceği bildirilmiştir (Gray ve Collins 1977; Karovicova ve Kohajdova, 2005). Yapılan bazı çalışmaların sonucunda da, kadaverinden NPIP oluşabildiği belirtilmiştir (Shalaby 1996; Wei ve ark., 2009).

Et ürünlerinde N-nitrozamin oluşumunda nitrat-nitrit tuzlarının yanı sıra sekonder aminlerin de matrikste bulunması gerekmektedir. Bu sebeple uzun süre muhafaza edilen etlerin, et ürünleri üretiminde kullanılması durumunda N-nitrozamin oluşum ihtimali de sekonder aminlerden dolayı artabilmektedir. N-nitrozaminler oluşumu açısından fermente ürünler, sosis ve salam gibi emülsifiye et ürünlerine göre, düşük pH değerlerinden dolayı daha risklidir.

N-nitrozamin oluşumundaki artışın çoğunlukla azot ve fosforlu bileşiklere bağlı olduğu belirtilmektedir (Rywotycki, 2007). Et ürünlerinde uygulanan ısı işlem, nitrozasyon dahil etteki değişimlerin hızlanmasında ya da yağlarla etkileşim halindeki azot oksit veya diğer nitrozlama ajanlarının açığa çıkmasını sağlayarak N-nitrozamin oluşumunu artırmaktadır (Herrmann ve ark., 2015a) Yağ fazında azot oksit ve oksijenin daha yüksek çözünürlükte olması N_2O_2 gibi bileşiklerin daha fazla oluşumuna neden olmaktadır ve N-nitrozamin oluşumunu etkilemektedir. Bu sebeple yağda çözünmeyen askorbil palmitat gibi bileşiklere göre eritrobik asit gibi yağda çözünen maddelerin N-nitrozamin inhibisyonunda daha etkili olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 1998; Herrmann ve ark., 2015b).

N-nitrozamin oluşumunu önlemek için; askorbik asit, fenoller, sülfür bileşikleri, amonyum iyonu, hidroksilamin, A vitamin gibi inhibitörlerin dahil edilmesi etkili olabilmektedir (Douglass ve ark., 1978). Kür edilmiş et ürünlerinde N-nitrozamin oluşumunu önlemek için askorbik asit, bitkisel polifenoller gibi antioksidanların kullanımı yaygındır (Rywotycki, 2007; Herrmann ve ark., 2015b; Wang ve ark., 2015). Antioksidanlar, reaktif oksijen ajanlarının lipid oksidasyonuna engel olarak istenmeyen tat ve aroma oluşumunu önlemektedir. Askorbik asit ve eritrobik asit gibi et ürünlerine ilave edilen antioksidanlar, nitroz asidi indirgeyerek nitrik oksit oluşturur. Nitroz asit veya nitritin reaktivitesi pH'nın düşüşü ile artmaktadır. Diazottrioksit (N_2O_3) ile askorbik asit arasındaki reaksiyon, (N_2O_3) ile sekonder aminler arasındaki reaksiyondan çok daha hızlı ilerlediği için N-nitrozamin oluşumu kısıtlanmaktadır (Herrmann, 2014).

Bazı durumlarda fenoller N-nitrozamin oluşumunu artırabilmektedir. Yüksek oranda nitrit varlığında 4-metilkateşolün, dimetilamin ve piperidin; klorojenik asidin piperidin; p-kresol ve p-nitrozo-o-kresolün ise pirolidine nitrozlanarak N-nitrozamin oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Walker ve ark., 1975; Challis ve Bartlett, 1975).

1.2 ve 1.4-dihidroksifenoller, 1.2.3- trihidroksifenol ve pek çok polifenol, N-nitrozaminlerin oluşumunu engellemektedir. Buna karşın monodihidroksifenoller ile bazı polihidroksifenoller N-nitrozamin oluşumu katalizlenmektedir (Gonzalez-Mancebo ve ark., 1999). Gallik asitin, piperezin ve aminofenazonun nitrozlanma tepkimesini inhibe ettiği ancak dietilaminin nitrozlanmasında pH ve diğer reaktif maddelerin durumuna göre katalizör olarak rol oynadığı tespit edilmiştir (Walker ve ark., 1975). Propil gallatın, prolin ve dimetilamininin nitrozlanma tepkimelerini durdurduğu bildirilmiştir (Gray ve Dugan, 1975; Sen ve ark., 1976; Astill ve Mulligan, 1977). Başka bir çalışmada ise tannik asit, α - tokoferol, t-bütil-hidroquinon, hidroquinon, vanilin ve timolün N-nitrozamin oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür (Gray ve Dugan, 1975; Astill ve Mulligan, 1977).

2.4. Et Ürünlerinde N-nitrozaminlerin Oluşumu ile İlgili Yapılan Çalışmalara Ait Literatür Özeti

Sucukta N-nitrozaminler üzerine ilk çalışma Özdemir ve ark., (1984) tarafından yapılmıştır. Çalışmada 7 farklı firmadan temin edilen örnekler kızartma işleminden önce ve sonra analiz edilmiş ve 6 örneğin NDMA, NDEA, NPYR ve NPIP içerdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar kızartma işlemi ile beraber kalıntı nitrit/nitrat miktarının da N-nitrozamin oluşumu açısından önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Piperazin, propil gallat, sodyum askorbatın N-nitrozamin oluşumuna etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, nitrozoprolidin oluşumunun engellenmesinde propil gallat ve piperezinin, sodyum askorbattan daha etkili olduğu görülmüştür (Sen ve ark., 1976).

Kür edilmiş bir et ürünü olan bacon ile yapılan bir çalışmada pişmiş domuz pastırmalarında nitrozoproliden NPYR oluştuğu, mangalda kızartmanın yağda kızartmaya göre daha az N-nitrozamin oluşumuna yol açtığı, pişirme süresi ve sıcaklığının N-nitrozamin oluşumunda önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bharucha ve ark., 1979).

Pirinççi ve ark., (1986) tarafından GC-MS kullanılarak yürütülen bir çalışmada, Elazığ, Konya, Kayseri ve Ankara bölgelerinden temin edilen sucuk örneklerinde belirlenen N-nitrozamindüzeyleri, NDMA için 5.1-370.0 µg/kg, NDEA için 2.5-60.00 µg/kg, NPYR için 6.5-200.0 µg/kg ve NPIP için ise 1.4-125.0 µg/kg arasında tespit edilmiştir.

Shahidi ve ark., (1994) tarafından tavuk salamları üzerinde yürütülen bir çalışmada ise % 10-20 oranında mekanik ayrılmış fok eti ve % 1-2 oranlarında fok eti proteini ilavesinin ve farklı pişirme yöntemlerinin (mikrodalga, ısıtma işlemi ve kızartma) NDMA oluşumu üzerinde önemli bir etki oluşturmadığı buna karşın tütüleme işleminin NDMA oluşumu önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir.

Geleneksel yöntemle üretilen domuz pastırması ile hindi eti, sığır eti, domuz eti + hindi eti ve sığır eti + hindi eti göğsünden üretilen 4 farklı domuz pastırması grubu üzerinde yürütülen bir çalışmada, örneklerin NDMA, nitrozodietilamin (NDEA), nitrozodibütilamin (NDBA), nitrozopiperidin (NPIP), NPYR ve nitrozothiazolidin (NTHZ) içerikleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda geleneksel yöntemle üretilen bacon örneklerinin ortalama 6.7 µg/kg (0.7-25 µg/kg) düzeyinde NPYR içerdiği, NPIP'in sadece biber içeren örneklerde bulunduğu, bacon benzeri ürünlerin geleneksel bacon örneklerine nazaran daha düşük seviyede NDMA ve NPYR içerdiği, geleneksel bacon örneklerinin tümünde NTHZ belirlendiği, ancak NDEA ve NDBA'nın sık olarak saptanmadığı rapor edilmiştir (Gloria ve ark., 1997).

Estonya'da tüketilmekte olan farklı et ürünlerinde N-nitrozamin seviyeleri belirleme amaçlı yapılan bir çalışmada, en yüksek NDMA tütülenmiş ve kızartılmış tavuk etlerinde, en yüksek NDEA seviyesi 0.88 µg/kg ortalama ile kızarmış tavuk etinde en yüksek NPYR oranı ise 20.67 µg/kg ile kırmızı biber ilaveli tavuk etinde saptanmış olup kırmızı biberin N-nitrozamin oluşum reaksiyonu öncüllerini içerebileceği bildirilmiştir (Yurchenko ve Mölder, 2007).

Rywotycki (2007) tarafından yapılan bir araştırmada, Polonya'da bulunan çeşitli et işleme tesislerinde kullanılan farklı et türlerinde; pişirme prosesi, sodyum klorür ve sodyum askorbat ilavesinin NDMA ve NDEA oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, sodyum klorür veya sodyum askorbatın N-nitrozamin oluşumunu azalttığı ve pişirme işleminin de N-nitrozamin seviyesini artırdığı ortaya konmuştur.

Sucuk, sosis, salam ve döner kebab üzerinde yapılan bir çalışmada örnekler NDMA, NDEA, NDPA, NPYR, NPIP, NDBA yönünden analiz edilmiştir. Analizler neticesinde sucuk, sosis, salam ve döner kebab örneklerinde sırasıyla toplam N-nitrozamin içerikleri 0.63-4.69 µg/kg, 0.45- 2.93 µg/kg, 0.80-2.23 µg/kg ve 0.51-16.63 µg/kg aralığında tespit edilmiştir (Özel ve ark., 2010).

Kürlenmiş et ürünlerine prolin, hidroksprolin ve pirolidin ilavesinin sodyum nitrit varlığında N-nitrozamin oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yüksek oranda NaNO₂ ve yüksek sıcaklık derecelerinde ısıtılma işlem uygulamalarının N-nitrozamin seviyesini önemli ölçüde artırdığı, ürünlerde NaNO₂ düzeyinin 150 ppm'i aşmadığı takdirde NDMA and NPYR oranlarının kaygı duyulacak seviyelere ulaşmadığı görülmüştür. Proline ilavesi NDMA oluşumuna etki etmezken, NPYR düzeyini önemli ölçüde artırmıştır. Hidroksprolin ilavesi NDMA üzerinde önemsiz bir artışa yol açarken NPYR oluşumu üzerine etki etmemiştir. Pirolidin ilavesi ise NPYR miktarını önemli ölçüde artırırken NDMA artışı üzerinde önemsiz etki göstermiştir (Drabik-Markiewicz ve ark., 2010).

Li ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışmada, kurutulmuş ve kür edilmiş sosislerde farklı pişirme yöntemlerinin (ısıtılma işlem, tavada kızartma, kızgın yağda kızartma, mikrodalga fırında pişirme) N-nitrozamin oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Analizler neticesinde sosislerin toplam N-nitrozamin içeriğinin 5.31 µg/kg olduğunu, derin yağda veya yağsız kızartmanın mikrodalga ve ısıtılma işlemine göre daha yüksek N-nitrozamin oluşumuna yol açtığı, kızartmanın NDMA, NDEA ve NPYR içeriklerini artırdığını rapor etmişlerdir.

Fermente sosislerde olgunlaştırma ve depolama aşamalarında N-nitrozamin oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada, olgunlaştırmanın 7, 14, 21 ve 28. günlerinde alınan örneklerde yapılan N-nitrozamin analizleri sonucunda, olgunlaştırma sırasında N-nitrozamin içeriği arttığı, bitki polifenollerin ve askorbik asidin N-nitrozamin içeriğini önemli derecede azalttığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2013).

Farklı işlemler görmüş (konserve edilmiş, tavada kızartılmış, mangalda kızartılmış, tütülenmiş ve kürlenmiş) et ürünleri ile ilgili yürütülen bir çalışmada ise ürünlerin N-nitrozamin içeriklerinin 2.60-13.28 µg/kg arasında değişim gösterdiği, en yüksek oranın mangalda kızartılan (toplam N-nitrozamin 13.28 µg/kg seviyesinde) ve tütülenen örneklerde saptandığı ve bunları tavada kızartılmış örneklerin izlediği bildirilmiştir. NDMA seviyesi tütülenmiş ve mangalda kızartılmış örneklerde 1 µg/kg düzeyini aşarken, NPYR ve NPIP ise tüm örneklerde 1.12 and 8,40 µg/kg gibi yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. NPIP ise yine tüm örneklerde 0.25-1.65 µg/kg arasında ölçülmüştür. Otoklavda konserve edilmiş olan taze etlerde N-nitrozamine rastlanmamış olması, NaNO₂'li kürlleme tuzu ilavesinin ve pişirme yöntemlerinin N-nitrozamin oluşumu üzerine etkili olduğunu göstermiştir (Mohammad Al-Kaseem ve ark., 2014).

Kadaverin ve piperidinin kuru fermente sosis üretiminde NPIP'in oluşumuna etkisini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada pH (4.9 ve 5.3), sodyum nitrit (0 ve 150 mg/kg) ve askorbat (0 ve 500 mg/kg) değişken faktörlerinin biyogen aminlerden NPIP oluşumu kuru fermente sosislerde incelenmiştir. Analizler sonucunda 500 mg/kg kadaverin ilavesinin N-nitrozamin oluşumunu artırmadığı, buna karşın piperidin ilavesinin (10 ve 100 mg/kg) NPIP miktarını artırdığı, pH'nın N-nitrozamin oluşumunda önemli bir etkisinin olmadığı, nitritin sodyum askorbat kullanılmaması durumunda NPIP oluşumunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir (De Mey ve ark., 2014b).

Yuan ve ark. (2015) tarafından Çin piyasasında satışı yapılan çeşitli et ürünleri üzerinde yapılan bir çalışmada, N-nitrozaminlerin en çok ızgara sosislerde oluştuğunu ve incelenen et ürünleri içerisindeki N-nitrozamin miktarlarının 0.42-51 µg/kg arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir.

Bitki polifenolleri, üzüm çekirdeği ekstraktı ve α-tokoferolün, kuru kürlleme ve depolama sırasında, kür edilerek üretilen bacon'ın N-nitrozamin oluşumuna etkileri belirlemek üzere yürütülen bir çalışmada, bitki polifenolleri ve α-tokoferolün NDMA oluşumu üzerine etkili olduğu, yeşil çay polifenollerinin NDMA oluşumunun engellenmesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015).

Belçika ve Danimarka’ da satışa sunulmuş bazı et ürünlerde uçucu ve uçucu olmayan N-nitrozaminler üzerinde yürütülen bir araştırmada, kızartma ve fırında pişirme işlemleri ile NPIP içeriğinin arttığı, uçucu olmayan N-nitrozamin (NVNA), nitrothiazolidin 4- karboksilik asit (NTCA) ve nitrozo-2-metil-thiazolidin 4-karboksilk asit (NMTCA) içeriklerinin azaldığı, NDMA ve NPYR’nin en çok 200°C sıcaklık dolaylarında olduğu daha yüksek sıcaklıklarda ise N-nitrozamin seviyesinin düştüğü saptanmıştır (Herrmann ve ark., 2015a).

Nitrit ilave edilerek üretilen pişirilmiş sosislerde N-nitrozamin oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada, farklı seviyelerde (0, 60, 100, 150, 250 veya 350 mg/kg) nitrit kullanılarak üretilen pişirilmiş domuz sosislerinin nitrit miktarının artışı ile; NPIP, NHPRO, NPRO, NTCA, NMTCA seviyeleri arasında doğrusal ilişki olduğu, NDMA ve NPYR seviyelerinin değişmediği veya tespit edilmediği, askorbik asit ilavesinin NHPRO, NPRO, NPIP ve NTCA oluşumunu engellediği askorbil palmitatın askorbik asite göre inhibe edici etkisinin daha az olduğu, karabiber içeriğinin artışı, NPIP ve NMTCA’nın seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir (Herrmann, 2014).

Çin ve Vietnam denizlerine has bir sazan türü (*Cirrhinus molitorella*) ile yapılan bir çalışmada ön tuzlama ve kurutma sıcaklıklarının N-nitrozamin oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, tuz uygulanmış balıkların toplam N-nitrozamin içerikleri ve çeşitliliği tuzlanmamış örnekler göre daha düşük bulunmuştur. Toplamda en yüksek N-nitrozamin oranı, 31.41 µg/kg ile (NPYR of 21.40 µg/kg, NMEA 1.46 µg/kg, NDEA 1.35 µg/ kg, NDPA 1.64 µg/kg ve NDPHA 4.56 µg/kg) 35°C kurutma işlemi uygulanmış balıklarda saptanmıştır. Genele bakıldığında 15°C’de kurutulan örneklerin N-nitrozamin oranları 45°C sıcaklıkta kurutulanlara göre daha düşük bulunmuştur. Tuz ilaveli balıklar üzerinde 45°C sıcaklıkta uygulanan kurutma işleminde, tuz oranı yükseldikçe N-nitrozamin oranları beklenmedik bir şekilde yükseliş gösterirken, en düşük N-nitrozamin oranları (3.79–5.38 µg/kg aralığında) tuz ilaveli ve 15°C’ ile kurutulmuş örneklerde tespit edilmiştir (Zeng ve ark., 2018).

Ramezani ve ark. (2020) tarafından çeşitli et ürünlerini kapsayan başka bir çalışmada, raf ömrü boyunca çeşitli değişimler incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, raf ömrü boyunca tüm ürünlerde N-nitrozamin oranları yükselmiş ancak bu artış örneklerin tamamında önemli ölçüde gerçekleşmemiştir.

Ürünlere ilave edilen nitrit tuzları, kalıntı nitrit ve pişirme sıcaklıklarının artışı N-nitrozamin miktarı üzerinde artış yönünde, askorbik asit ise azalış yönünde etki etmiştir. Ayrıca raf ömrü boyunca askorbik asit miktarında da azalış görülmüştür.

Çay, elma ve tarçından izole edilen fenolik bileşiklerin domuz pastırmaları üzerindeki değişimlerin incelendiği bir çalışmada ise tüm bu fenolik bileşiklerin pastırmalarda lipid oksidasyonu ve kalıntı nitritin yanında nitrozodimetilamin oluşumunu, kontrol örneklerine göre önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Deng ve ark., 2022).

Seo ve ark. (2022) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise farklı pişirme yöntemlerinin (kavurma, kızartma, şok haşlama) Güney Kore pazarında satılan çeşitli et, süt ve su ürünlerinde nitrosodimetilamin, nitrosometiletilamin, nitrosodietilamin, nitrosodibutilamin, nitrosopiperidin, nitrosopirrolidin ve nitrosomorpholin oluşumu araştırılmış, nitrosodietilamine içeriğinin şok haşlama işlemi ile yükseldiği, kavurma işleminin en çok nitrosodimethylamine oranını artırdığı, mikrodalga pişirmenin ise en çok nitrozodietilamin konsantrasyonunu yükselttiği görülmüştür. Tüm gıda örneklerind en sık saptanan N-nitrozamin nitrozodimetilamin olurken, toplamda en yüksek miktarda N-nitrozamin kaynatılmış su ürünlerinde tespit edilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında sucukların üretimi, Ankara Et ve Süt Kurumu Sincan Et Kombinasi tesisinde gerçekleştirilmiştir. Sucuk üretiminde kullanılan sığır eti, Et ve Süt Kurumu Sincan Et Kombinasyonundan temin edilmiştir. Kesimden sonra 1 gün dinlendirilmiş karkasların; kaburga, gerdan, paçeta ve üst kol kısmından, kıymalık lop etler ve böbrek yağları ayrılmış, kaba bağ dokuları mümkün olduğunca uzaklaştırılmış ve yağ oranı yaklaşık % 25 olacak şekilde böbrek yağı ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan etler 5 mm ayna bıçaklı kıyma makinesinden (Seydelmann mg 160) çekilmiştir. Et ve yağ seçiminde materyalin sucuk üretimine uygunluğu esas alınmıştır.

Araştırma 3 tekerrürlü olarak planlandığından her bir tekerrür için farklı partilere ait karkaslar kullanılmıştır. Sucuk üretiminde kullanılan nitritli kürleme tuzu Ankara piyasasından (Safir, Ankara) sarımsak Kastamonu Taşköprü bölgesinden ve baharatlar Bağdat firmasından temin edilmiştir. Sucuk hamurunun doldurulmasında kollajen bağırsaklar (çap 40mm, Selka) ve otomatik dolum makinesi (Vemag Hp-7E) kullanılmıştır. Starter kültür olarak *Pediococcus pentosaceus* ve *Staphylococcus carnosus* (Bactoferm, CHR-HANSEN) tercih edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1 Sucuk örneklerinin üretimi

Araştırmada, üretim parametrelerinden askorbik asit seviyeleri, ısıtma işlem sıcaklıkları değiştirilerek üretim ve depolama sürecinin sonuna kadar N-nitrozamin oluşum düzeyleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda kontrol grubu olarak Et ve Süt Kurumu standart sucuk üretim formülasyonuna uygun olarak askorbik asit (500 mg/kg), standart üretimin iki katı askorbik asit (1000 mg/kg) ve üç katı askorbik asit (1500 mg/kg) içeren üç ayrı sucuk hamuru oluşturulmuştur.

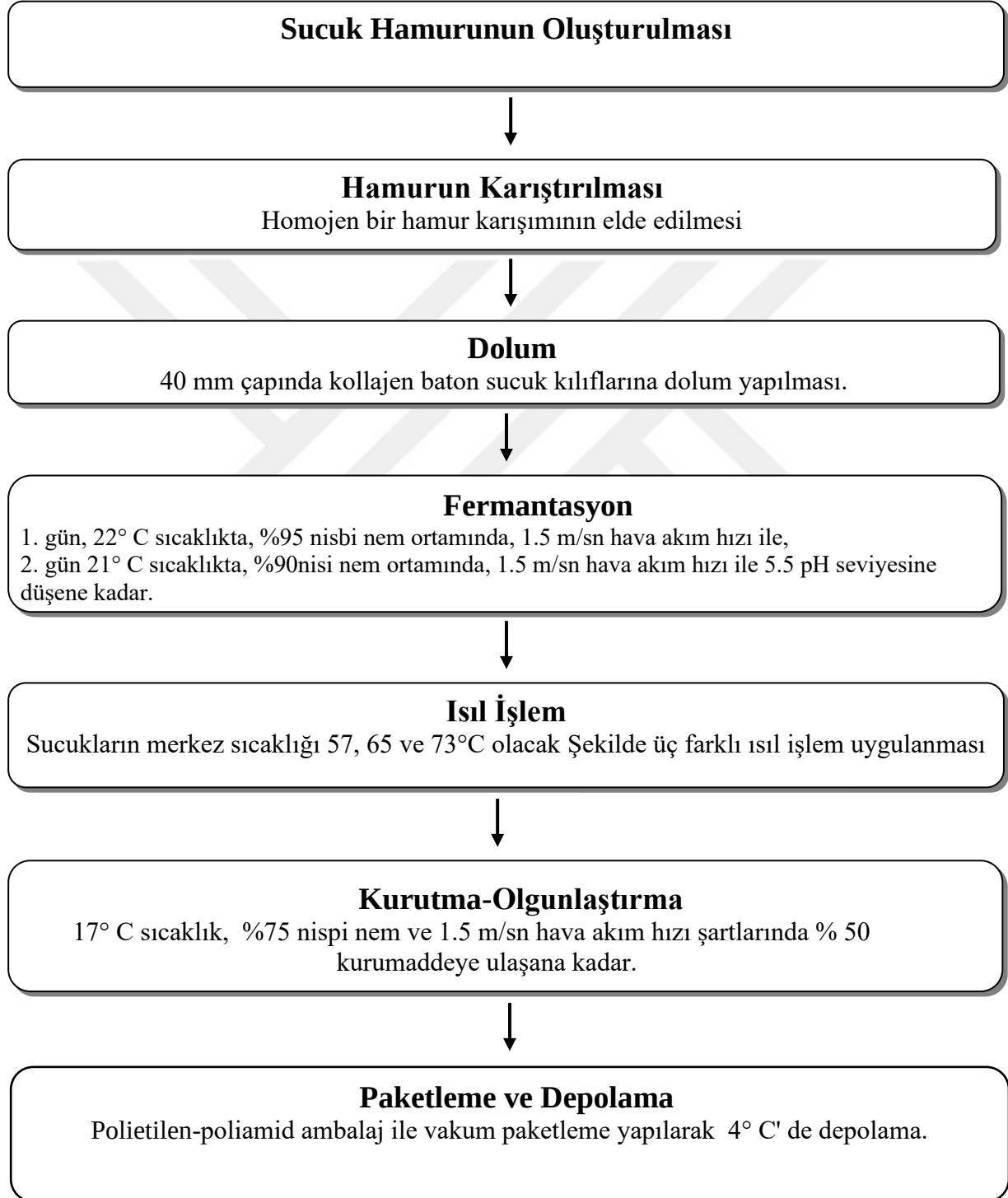
Tez çalışmasının bundan sonraki kısımlarında; 500 mg/kg askorbik asit ilaveli örnekler 1. formülasyon, 1000 mg/kg askorbik asit ilaveli örnekler 2. formülasyon, 1500 mg/kg askorbik asit ilaveli örnekler 3. formülasyon olarak anılacaktır. Denemelerde üretimi yapılan sucuklarda kullanılan hammadde ve katkı maddelerinin miktarlarına ilişkin veriler Çizelge 3.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Sucuk Hamuru Bileşenleri (100 kg sucuk hamuru için)

Bileşen	Miktar (kg)
Kıyma (% 25 yağlı)	92.55
Sarımsak	2
Kırmızı Biber	3
Karabiber	0.5
Kimyon	1
Sakkaroz	0.3
Yenibahar	0.35
Sodyum Polifosfat	0.3
Askorbik Asit	0.05 / 0.1 / 0.15

3.2.1.1 Sucuk üretim aşamaları

Sucuk üretim aşamaları Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. Sucuk üretimi aşamaları

3.2.1.1.1. Sucuk hamurunun hazırlanması

Sucuk hamuru çizelge 3.1’de verilen miktarlarda yağlı sığır eti, baharatlar, sodyum polifosfat ve askorbik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan sucuk hamurları, mikser (Seydelman, Almanya) vasıtasıyla homojen şekilde karıştırılmıştır. Şekil 3.2’de hamur hazırlık aşaması görülmektedir.



Şekil 3.2. Sucuk hamurunun hazırlanması.

3.2.1.1.2. Sucuk hamurunun kılıflara dolumu

Dolum işlemi, 40 mm çaplı kollajen kılıflara (Selka, Türkiye) otomatik dolum makinesi ile (Vemag dp10e, Almanya) yapıldı. Şekil 3.3’ te dolum aşaması görülmektedir.



Şekil 3.3. Sucuk hamurunun kılıflara dolumu

3.2.1.1.3. Fermantasyon aşaması

Sucuklar kılıflara dolum işleminden sonra fermantasyon işlemi için iklimatik odalara alınmıştır.

1. günde 22°C sıcaklık % 95 nispi nem ve 1.5 m/sn hava akım hızında, 2. günde ise 21°C sıcaklıkta % 90 nispi nemde ve 1.5 m/sn hava akım hızında, 5.4 pH değerine ulaşınca kadar fermantasyon sürdürülmüştür. Şekil 3.4’de fermantasyon işlemi görülmektedir.



Şekil 3.4. Fermantasyon aşaması

3.2.1.1.4. Isıl işlem aşaması

Fermantasyonu tamamlanmış sucuk örnekleri ısıl işlem fırınlarına alınmıştır. Sucukların en geç ısınan merkez noktalarına termometre propları takılmış ve hedef sıcaklıklar olan; 57°C, 65°C ve 73°C’ye ulaşıldığında ayrı ayrı numuneler alınmıştır. Isıl işlem görmüş sucuklara 57°C’nin altında ısıl işlem uygulandığında istenilen yapı gelişmemektedir. Buna karşın 73°C’nin üzerine çıkıldıkça yağ kusması olarak tabir edilen, yağın kılıf ile hamur arasına toplanması olayı gerçekleşerek sucukların görsel nitelikleri bozulmaktadır. Isıl işlem normları seçilirken bu hususlar dikkate alınmıştır. Şekil 3.5’de ısıl işlem aşaması görülmektedir.



Şekil 3.5. Isıl işlem aşaması

3.2.1.1.5 Olgunlaştırma aşaması

Isıl işlem görmüş ve istenen yapıya kavuşmuş sucuk örnekleri iklimlendirme odalarına alınmıştır. Bu aşamada % 75 nem 17°C sıcaklık ve 1.5 m/sn hava akım hızı şartlarına sahip ortamda sucuk örnekleri Türk Gıda Kodeksinin öngördüğü % 50 nem oranına gelene kadar kurutularak olgunlaştırılmıştır. Bu aşama 48 saat sürmüş ve süre sonunda sucuklardan numuneler alınmıştır. Şekil 3.6’da olgunlaşma aşaması görülmektedir.



Şekil 3.6. Kurutma ve olgunlaştırma aşaması

3.2.1.1.6 Ambalajlama aşaması

Olgunlaştırma aşamasından sonra tüketime hazır hale gelen sucuk örnekleri, poliamid-polietilen ambalaj ile vakum tekniği ile paketlenmiş ve +4°C lik odalarda muhafaza altına alınmıştır. Bu aşamada raf ömrü boyunca N-nitrozamin miktarlarındaki değişim incelenmek üzere 30. 60. ve 90. günlerde numuneler alınmıştır. Denemelerde tüm işlemler 3 tekerrür halinde gerçekleştirilmiş ve alınan numuneler analiz edilinceye kadar -18° C’de muhafaza altına alınmıştır. Şekil 3.7’de ambalajlama aşaması görülmektedir.



Şekil 3.7. Ambalajlama Aşaması

3.2.2. Pişirme işlemleri

Depolama süresi sonunda 3 farklı pişirme tekniği uygulanmış ve pişirme tekniklerinin sucuk örneklerinde uçucu N-nitrozamin oluşumuna etkisinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla yağda kızartma, mikrodalga ve ızgara (mangal) işlemleri, sucuklara iki paralel olacak şekilde uygulanmıştır. Bu aşama için % 0.05 askorbik asit içeren sucuklardan olgunlaşması tamamlanmış olanlar pişirme işlemlerinde kullanılmıştır. Pişirme işlemlerinde uygulanacak parametreler, ön denemeler sonucunda belirlenmiştir.

Kızartma işlemi kızgın ayçiçek yağı ile teflon tavada 20 sn, mikrodalga pişirme işlemi; ev tipi mikrodalga fırında, cam kasede 260°C sıcaklıkta 10 sn, ızgara işlemi ise kömür köz haline geldikten sonra yaklaşık 40 sn boyunca uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler N-nitrozamin analizleri yapılınca kadar -18° C depolarda muhafaza altına alınmıştır. Şekil 3.8’de pişirme işlemlerine ait görseller görülmektedir.



Şekil 3.8. Pişirme İşlemleri

3.2.3. Numune hazırlama metodu

Üretim, tüketim ve muhafaza sürecine ait belirlenen aşamalardan alınan numuneler, LC-MS cihazı ile analize uygun hale getirilmek amacıyla, öncelikle ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi, Yuan ve ark. (2015) tarafından geliştirilen yöntem esas alınarak yapılmıştır. Örnekler şekil 3.9’da görüldüğü gibi blender ile parçalanarak homojenize edilmiştir.



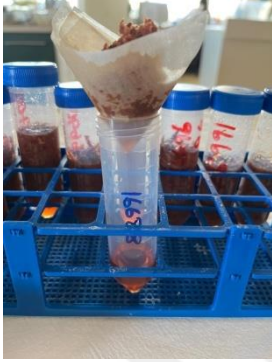
Şekil 3.9. Örneklerin parçalanması

Sucuk numuneleri homojenize edildikten sonra hassas terazi ile 20 g tartılmış ve bir beher içerisinde alınıp üzerine 40 mL dikolorometan (DCİM) eklenmiştir. DCİM içerisindeki numuneler hedef maddenin çözücü içerisinde daha fazla miktarda geçmesi amacı ile Şekil 3.10’de görüldüğü gibi ultrasonik su banyosunda 15 dk boyunca bekletilmiştir.



Şekil 3.10 Ultrasonik Su Banyosu

Su banyosunda bekleme süresi sonunda örnekler Şekil 3.11’de görüldüğü gibi filtre kâğıdı ile süzölmüştür. Sonrasında örnekler yeniden DCIM ile muamele edilerek tekrar su banyosunda 15 dk süresince bekletilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.



Şekil 3.11. Süzöntü toplama

Toplanan filtrat, rotary evaporatöre aktararak Şekil 3.12’de görüldüğü gibi içerisindeki çözücümadde (DCIM) uzaklaştırılmıştır. Bu aşama 185 rpm dönüş hızında 13 dk süre içerisinde tamamlanmıştır.



Şekil 3.12. Rotary evaporatör

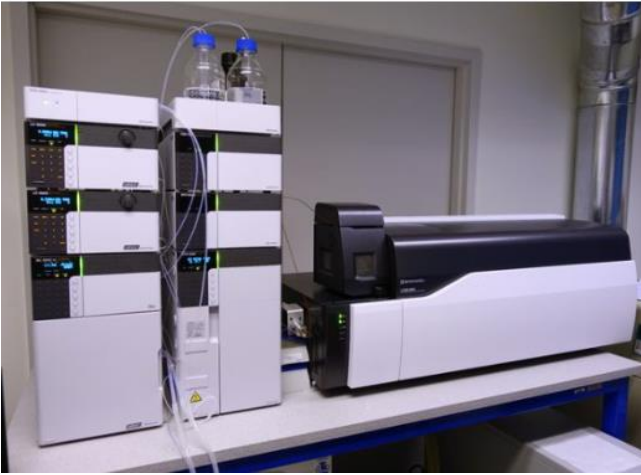
Çözücüsü uzaklaştırılan ekstrakt, 1 ml metanol ile çözülmek, filtre edilmiş ve cam viallere alınmıştır (şekil 3.13). Viallere alınmış numuneler vorteks ile homojenize edilip analiz edilinceye kadar -18 °C de ağzı kapalı ve parafilm ile yalıtılmış biçimde muhafaza edilmiştir. Şekil 3.13’de viallere alınmış örneklerin bir kısmı görölmektedir.



Şekil 3.13. Analize hazırlanmış örnekler.

3.2.4. N-nitrozaminlerin tayini

Ekstrakte edilmiş sucuk numuneleri içerisindeki N-nitrozamin bileşiklerinin düzeyleri LC-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (DAYTAM) laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.14). LC-MS/MS cihazı ile yürütülen analize ait parametreler çizelge 3.2 ve 3.3’de görülmektedir.



Şekil 3.14 LC-MS/MS Cihazı

Çizelge 3.2 LC-MS/MS koşulları

LC Koşulları		MS Koşulları	
Kolon	Acclaim 120 C18 4.6 x 150 mm, 3 µm	İyon kaynağı	APCI
Fırın sıcaklığı	40°C	Gaz Sıcaklığı	290 °C
Mobil faz A	% 0.1 oranında suda çözünmüş formik asit	Nebulizatör	
Mobil faz B	% 0.1 oranında metanolde çözünmüş formik asit	Basıncı:	25 psi
Akış hızı	0.400 mL/dk	Buharlaştırıcı	
Enjeksiyon hacmi	10 µL	Sıcaklığı	350 °C
Durulama solüsyonu	80:20, metanol:su	Kurutma Gazı	
Autosampler Sıcaklığı	10 °C	Akışı	11 L/dk

Çizelge 3.3 LC-MS/MS gradient sistem çözücü konsantrasyonları

Zaman (dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)
0	86	14
5	86	14
7	50	50
11	33	67
16	33	67
19	20	80
24	20	80
24.5	86	14
32	86	14

Tez çalışmasında, her bir uçucu N-nitrozamin türevi için 2000 µg/kg düzeyinde daha önceden hazırlanan stok standart çözelti LC-MS/MS cihazında belirlenen metot ile analize alınmış ve kromotogram elde edilmiştir (Ek 7.1).

Metodun doğrulanması amacıyla analizi yapılacak olan uçucu N-nitrozamin bileşiklerine ait kalibrasyon eğrilerinin elde edilebilmesi için belli konsantrasyonlara (5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/kg) seyreltilmiş standart örneklerin analizi yapılarak her bir N-nitrozamin türevine ait kalibrasyon eğrileri ile R^2 değerleri belirlenmiştir. Söz konusu standartlara ait kalibrasyon eğrileri Ek 7.2’de sunulmuştur.

3.2.5. Geri kazanım çalışması

Geri kazanım çalışması kapsamında öncelikle şahit örnek olarak nitrit tuzu ilave edilmedensucuk hamuru oluşturulmuş ve hazırlanan bu hamur üzerinde, ısıtma işlemi veya fermantasyon uygulanmadan ekstraksiyon işlemi yapılarak N-nitrozamin tayini için analize alınmıştır. Sonrasında hamura; 5 µg/kg, 50 µg/kg ve 100 µg/kg standart madde ilave edilmiş ve analiz tekrarlanmıştır. Şahit örnekte ölçülebilir düzeyde N-nitrozamin saptanmamış olup 50 µg/kg standart madde ve 100 µg/kg standart madde ile zenginleştirilmiş spike numunelerine ait kromatogramlar Ek 7.3’de sunulmuştur. Çizelge 3.1’de analiz edilen N-nitrozaminler için geri kazanım değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.4. N-nitrozaminler için geri kazanım değerleri.

Spike Seviyesi (µg/ml)	NDMA Geri kazanım (%)	NMEA Geri kazanım (%)	NDEA Geri kazanım (%)	NPYR Geri kazanım (%)	NPİP Geri kazanım (%)	NDBA Geri kazanım (%)	NDPA Geri kazanım (%)
5	81.34	78.23	84.38	78.12	97.32	78.71	94.34
50	79.49	81.56	91.79	84.43	79.31	96.37	86.21
100	83.21	86.43	89.32	97.06	85.05	93.56	87.32

3.2.6. Tekrarlanabilirlik LOD ve LOQ değerleri

Tekrarlanabilirlik; aynı analizin, aynı cihaz ve aynı laboratuvarında kısa zaman aralığında defalarca yapılmasıyla elde edilen sonuçların standart sapmasıdır. Tekrarlanabilirlik değerleri, DAYTAM tarafından 50 µg/kg standart N-nitrozamin çözeltisinin 10 defa üst üste analizi sonucu elde edilen değerlerin standart sapması olarak belirlenmiştir. LOD değeri, metodun tayin edebildiği en düşük konsantrasyon değerini temsil etmektedir. Bunu hesaplamak için cihaza, sıfıra yakın çok düşük seviyede standart çözelti enjekte edilmiştir. LOD değeri bu analizin tekrarlanabilirlik standart sapma değerinin 3 katı alınarak hesaplanırken LOQ değeri ise yine standart sapma değerinin 10 katı alınarak belirlenmiştir. Çizelge 3.2’de N-nitrozamin analiz metoduna ait sayısal parametreler verilmiştir.

Çizelge 3.5. Analiz metoduna ait sayısal değerler

N-nitrozamin	Linear Eşitlik	Korelasyon Katsayısı	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Tekrarlanabilirlik (%RSD)
NDMA	$y=619.351x+254.631$	$r^2=0.99930928$	0.81	2.70	9.64
NMEA	$y=324.335x-106.091$	$r^2=0.99930887$	0.64	2.13	4.77
NDEA	$y=274.628x+254.631$	$r^2=0.9990821$	0.25	0.83	8.24
NPYR	$y=2228.145x+172.916$	$r^2=0.9991338$	0.31	1.03	6.89
NPIP	$y=619.351x+254.631$	$r^2=0.9990868$	0.18	0.60	8.91
NDBA	$y=763.0359x-111.723$	$r^2=0.9992366$	0.92	3.07	7.51
NDPA	$y=881.1971x+360.464$	$r^2=0.9988666$	1.04	3.47	5.31

3.2.7. Bazı fizikokimyasal analizler

Sucuk örneklerinin pH değeri ile protein ve yağ içerikleri, Et ve Süt Kurumu Sincan Kombina Müdürlüğü laboratuvarında yer alan Foss Foodscan Lab cihazı (şekil 3.25) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla olgunlaşmasını tamamlamış sucuklardan örnekler alınarak analiz edilmiştir.

Bu metotta kimyasal analiz, elektromanyetik spektrumun, Yakın Bölge İnfrared (NIR) alanındaki (700-2500 nm) ışınları kullanılarak gerçekleşmektedir. NIR ışınları; OH, NH ve CH bağlarını içeren kimyasal bileşiklere sahip numunelere uygulandığında, bu spesifik dalga boylarında numune tarafından enerjinin bir kısmı absorbe edilir ve bu nedenle yansıyan ışığın bu bölgelerdeki yoğunluğu düşer. Yansıyan sinyaldeki (spektrum) farklılıklar, kimyasal konsantrasyon farklılıklarıyla ilişkilendirilir ve bu NIR kalibrasyonunun temelini oluşturur.

Örnek olarak, proteinler, amino asitlerde bulunan amin gruplarının varlığı ile karakterize edilir. Amin grupları çeşitli seviyelerde NIR spektrumu boyunca birden fazla bölgede NIR radyasyonunu absorbe eder. Numunede ne kadar fazla protein varsa, bu bölgelerde absorbe edilen enerji o kadar fazla ve yansıyan enerji bu bölgede daha az yoğunluğa sahiptir.

Kullanılan cihazın NIR transmitans, dalgaboyu 850 - 1100 nm ve NIR reflektans, dalgaboyu 400 - 700 nm aralığındadır.



Şekil 3.15 Foss Foodscan Lab Cihazı

3.2.8. İstatistiksel analizler

Verilerin analizi, *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 26.0 Statistics* paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı askorbik asit oranı ve ısıtma işlem parametrelerinin, fermentasyon, ısıtma işlem, olgunlaştırma ve raf ömrü süresince ölçülen değerler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu süreçte, verilerin normallik dağılımı değerlendirilmiş ve ortalama ile standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Farklı askorbik asit düzeyleri ve ısıtma işlem sıcaklıklarının, fermentasyon, depolama süreleri ve farklı pişirme tekniklerinin 7 farklı N-nitrozamin değeri üzerindeki etkisi, *Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi* ile incelenmiştir. Ayrıca, 9 farklı grup içindeki ölçümler arasındaki farklılıklar *Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA* ile analiz edilmiştir. Her bir ölçümün 9 farklı grup açısından karşılaştırılması *One Way ANOVA* testi ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesi için Post Hoc testlerinden *Bonferroni ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testleri* kullanılmıştır. Tüm analizlerde, istatistiksel anlamlılık düzeyleri 0.05 ve 0.01 olarak belirlenmiş ve değerlendirmeler bu çerçevede yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sucukların pH Değeri, Nem, Protein ve Yağ Miktarı

Olgunlaşması tamamlanmış sucuk örneklerinin bazı fizikokimyasal özelliklerine ilişkin değerler Çizelge 4.1’ de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Sucukların bazı fizikokimyasal özellikleri

Özellik	1. Formülasyon	2. Formülasyon	3. Formülasyon
Protein (%)	20.1± 0.39	20±0.4	20.1±0.38
Nem (%)	50±0.83	50.1±0.73	50.15± 0.84
Yağ (%)	35.05±0.79	35±0.717	35.12±0.7
pH	5.39±0.07	5.36±0.077	5.37±0.069

Sonuçlar incelendiğinde, % 0.05 askorbik asit ilaveli 1. formülasyon, % 0.1 askorbik asit ilaveli 2. formülasyon ve % 0.15 askorbik asit ilaveli 3.formülasyon sucuk grupları arasında; protein, yağ,nem ve pH değerleri yönünden önemli bir fark bulunmamaktadır (p>0.05).

4.2. Nitrat-Nitrit Miktarı

Gıdalarda N-nitrozamin oluşumunda nitrat/nitrit varlığının etkili olduğu bilinmektedir. Bu yüzden öncelikle başlangıç hammaddeleri olan et ve yağ karışımı, baharat karışımı ve su numunelerindeki nitrat-nitrit düzeyleri belirlenmiştir. Tespit edilen nitrit ve nitrat düzeyleri mg/kg ve mg/L olarak Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında hammaddelerde iz miktarda nitrit ve nitrat bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. Nitrat ve Nitrit miktarları

Hammadde	Nitrit Miktarı	Nitrat Miktarı
Et-Yağ Karışımı	T.E	T.E
Su	0.87 mg/kg	1.29 mg/kg
Baharat Karışımı	1.36 mg/kg	2.18 mg/kg

T.E: Tespit edilemedi

4.3. Nitrozodimetilamin Miktarı

Farklı oranlarda askorbik asit kullanılarak ve ısıtıl işlem uygulanarak üretilen fermente sucukların NDMA değeri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Sucuklarda olgunlaştırma işleminden raf ömrü sonuna kadar belirlenen NDMA değeri 0.73-5.34 µg/kg aralığındadır. Isıtıl işlem derecesine ve askorbik asit oranlarına bağılı olarak NDMA miktarlarında değışimler olmuştur. En yüksek NDMA değeri (5.34 ± 0.66 µg/kg) 1. formülasyon ile üretilen ve 73°C ısıtıl işlem uygulanmış sucuklarda saptanmıştır. Bu örneklerde 90. günün sonunda NDMA oranı 5.34 µg/kg değeri kadar yükselmiştir, % 0.15 askorbik asitli 3. formülasyonda ise uygulanan ısıtıl işlem NDMA üzerinde etkili olmuş ve raf ömrü sonunda 2.08 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerde askorbik asit NDMA üzerinde azaltıcı etki göstermiş buna karşın uygulanan ısıtıl işlem fermentasyon ve raf ömrü boyunca depolama aşamaları NDMA miktarını artırmıştır.

Üretim ve depolama süreci ile NDMA seviyeleri arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), bu da NDMA seviyelerinin zaman içinde belirgin şekilde değıştiğini ve özellikle depolama sürecinde arttığını göstermektedir.

NDMA oranları ile askorbik asit oranı arasındaki etkileşim de anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Daha yüksek askorbik asit oranlarında (% 0.15) NDMA seviyeleri başlangıçta düşük kalırken, depolama süreci boyunca artış eğilimi göstermiştir. Düşük askorbik asit oranlarında (%0.05 ve % 0.1), NDMA seviyeleri daha hızlı yükselmiştir.

Isıtıl işlem sıcaklığı ile NDMA oluşumu incelendiğinde, % 0.15 askorbik asitli gruplar arasında önemli bir fark olmadığı, diğeri gruplar arasındaki farkın ise ısıtıl işlem derecesi ile korelasyon göstermediği görülmektedir.

Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem derecelerinin fermentasyon, ısıtıl işlem ve raf ömrü boyunca NDMA oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde, her biri farklı kombinasyonlardan oluşan toplam 9 grubun tamamında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.3. Farklı Askorbik Asit Oranları ve Isıl İşlem Dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDMA Miktarı (µg/kg)

Askorbik asit oranı (%)	Isıl işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıl işlem	Olgunlaştırma	Raf Ömrü 30. Gün	Raf Ömrü 60. Gün	Raf Ömrü 90. Gün	p^1
		<i>Ort.±S.S.</i>	<i>Ort.±S.S.</i>	<i>Ort.±S.S.</i>	<i>Ort.±S.S.</i>	<i>Ort.±S.S.</i>	<i>Ort.±S.S.</i>	
% 0.05	57°C		1.44 ± 0.23Ab	2.43 ± 0.28Bb	2.47 ± 0.51Bb	3.27 ± 0.37Cc	4.07 ± 0.51Dc	0.025*
	65°C	1.37 ± 0.21Ab	1.58 ± 0.24Ab	1.35 ± 0.31Aa	3.06 ± 0.62Bc	3.65 ± 0.33Cc	4.30 ± 0.77Dc	0.015*
	73°C		1.58 ± 0.24Ab	3.70 ± 0.38Bc	4.00 ± 0.62Bd	5.01 ± 0.5Cd	5.34 ± 0.66Dd	0.011*
%0.1	57°C		1.47 ± 0.19Ab	2.13 ± 0.56Bb	2.07 ± 0.35Bb	3.13 ± 0.67Cc	3.81 ± 0.39Dc	0.023*
	65°C	1.00 ± 0.1Aa	1.58 ± 0.24Bb	1.25 ± 0.25Aa	2.37 ± 0.45Cb	2.66 ± 0.64Cb	2.96 ± 0.58Db	0.049*
	73°C		1.81 ± 0.28Bb	2.12 ± 0.22Cb	2.8 ± 0.36Db	2.66 ± 0.61Db	3.13 ± 0.67Eb	0.041*
% 0.15	57°C		0.77 ± 0.2Aa	0.84 ± 0.09Aa	1.57 ± 0.36Ba	2.47 ± 0.51Cb	3.06 ± 0.62Db	0.032*
	65°C	1.02 ± 0.21Aa	0.88 ± 0.07Aa	0.96 ± 0.26Aa	2.13 ± 0.56Bb	2.67 ± 0.41Cb	2.95 ± 0.67Db	0.027*
	73°C		0.73 ± 0.18Aa	1.06 ± 0.31Aa	1.54 ± 0.48Ba	1.77 ± 0.25Ca	2.08 ± 0.32Da	0.003**
p^2		0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

Etkileşim Ölçüm $p=0.000^{**}$; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı $p=0.000^{**}$; Ölçüm×Isıl İşlem Derecesi $p=0.011^{*}$; ÖA×AAO×İİD $p=0.023^{*}$

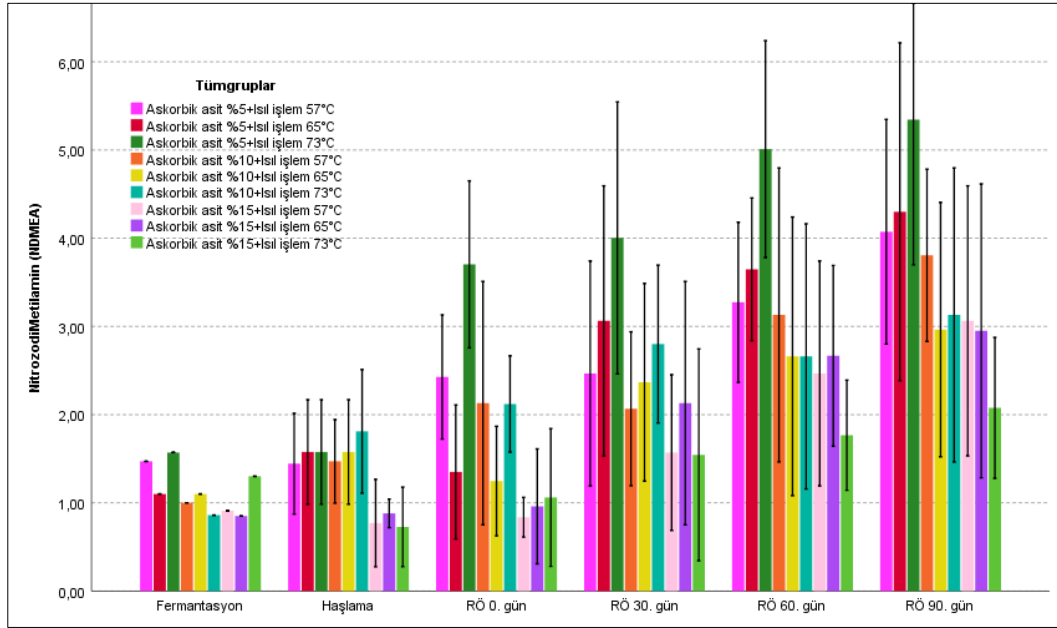
* $p<0.05$; ** $p<0.01$. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

$p1$: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

$p2$: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

NDMA oluşumunun raf ömrü, ısıtma sıcaklığı ve askorbik asit oranının üçlü birleşik etkisine bağlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Özellikle düşük askorbik asit oranlarında ve yüksek sıcaklıklarda NDMA seviyelerinin zamanla hızla arttığı belirlenmiştir. Buna karşın, % 0.15 askorbik asit oranı NDMA artışını belirgin şekilde baskılamıştır.



Şekil 4.1. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma derecelerinin üretim ve depolama süresince NDMA oluşumu üzerine etkileri

Fermantasyon aşamasında, % 0.05 askorbik asit uygulanmış örneklerde NDMA, (1.37 ± 0.21) en yüksek değere ulaşırken, % 0.1 askorbik asit oranında, 1.00 ± 0.1 ve % 0.15 askorbik asit uygulaması ile 1.02 ± 0.21 değerleri elde edilmiştir. Fermantasyon aşamasında NDMA miktarındaki değişimler, 2. ve 3. formülasyon örneklerde istatistiki olarak önemsiz ($p>0.05$) olmuştur.

Isıl işlem sürecinde, % 0.05 askorbik asit oranında, farklı ısıtma derecelerinde (1.44 ± 0.23 , 1.58 ± 0.24 , 1.58 ± 0.24) anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). % 0.1 askorbik asit oranında, en düşük NDMA değeri 57°C’de (1.47 ± 0.19) bulunmuş, 65°C ve 73°C’de ise değerler artış göstermiştir (1.58 ± 0.24 ve 1.81 ± 0.28). % 0.15 askorbik asit oranında, en düşük NDMA oranı, 73°C’de (0.73 ± 0.18) tespit edilirken, 57°C ve 65°C’deki ölçümler (0.77 ± 0.2 ve 0.88 ± 0.07) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Olgunlaşma aşamasında, %0.05 askorbik asit oranında NDMA miktarları, 57°C’de (2.43 ± 0.28). 65°C’de (1.35 ± 0.31) ve 73°C’de (3.70 ± 0.38) seviyelerinde tespit edilmiştir. En düşük NDMA seviyesi 65°C’de tespit edilirken, en yüksek seviye 73°C’de gözlenmiştir. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C ve 73°C gruplarında (2.13 ± 0.56 ve 2.12 ± 0.22) istatistiksel olarak benzer seviyeler tespit edilmiş, 65°C’de ise (1.25 ± 0.25) önemli ölçüde düşük bulunmuştur. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C (0.84 ± 0.09). 65°C (0.96 ± 0.26) ve 73°C (1.06 ± 0.31) gruplarında NDMA seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. En düşük seviyeler bu grupta gözlenmiştir, bu da askorbik asidin NDMA oluşumunu azalttığını göstermektedir.

Raf ömrünün 30. gün ölçümlerinde NDMA miktarları, % 0.05 askorbik asit oranında, 57°C (2.47 ± 0.51). 65°C (3.06 ± 0.62) ve 73°C (4.00 ± 0.62) seviyelerine ulaşmıştır. NDMA seviyesi 57°C ve 65°C grupları arasında anlamlı şekilde artış gösterirken ($p < 0.05$), 73°C’de en yüksek seviyeye ulaşmıştır. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C (2.07 ± 0.35). 65°C (2.37 ± 0.45) ve 73°C (2.8 ± 0.36) seviyelerinde gözlemlenmiştir. Burada 57°C ve 65°C grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), 73°C’de belirgin bir artış tespit edilmiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C (1.57 ± 0.36). 65°C (2.13 ± 0.56) ve 73°C (1.54 ± 0.48) seviyelerinde NDMA oluşumu gözlemlenmiştir. NDMA seviyeleri 65°C grubunda önemli bir artış göstermiş ($p < 0.05$) ancak 73°C grubunda 57°C ile benzer düzeyde kalmıştır.

Raf ömrünün 60. gün ölçümlerinde, %0.05 askorbik asit oranında, 57°C (3.27 ± 0.37). 65°C (3.65 ± 0.33) ve 73°C (5.01 ± 0.5) seviyelerine ulaşmıştır. NDMA seviyeleri zamanla artış göstermiş, özellikle 73°C’de en yüksek seviyeye ulaşılmıştır. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C (3.1 ± 0.67). 65°C (2.66 ± 0.64) ve 73°C (2.66 ± 0.61) seviyelerinde bulunmuştur. 57°C’de NDMA seviyesi artış göstermiş ancak 65°C ve 73°C gruplarında birbirine yakın seviyelerde kalmıştır. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C (2.47 ± 0.51). 65°C (2.67 ± 0.41) ve 73°C (1.77 ± 0.25) seviyelerinde gözlenmiştir. NDMA seviyesi 73°C’de anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşük bulunmuş, 57°C ve 65°C grupları arasında ise önemli bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Raf ömrünün 90. gün ölçümlerinde, %0.05 askorbik asit oranında, 57°C (4.07 ± 0.51). 65°C (4.3 ± 0.77) ve 73°C (5.34 ± 0.66) seviyelerine ulaşmıştır. En yüksek NDMA seviyesi 73°C’de ölçülmüş olup, 57°C ve 65°C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). % 0.1 askorbik asit oranında NDMA, 57°C (3.81 ± 0.39). 65°C (2.96 ± 0.58) ve 73°C (3.13 ± 0.67)

seviyelerinde tespit edilmiştir. 65°C ve 73°C arasındaki NDMA seviyeleri istatistiksel olarak benzer bulunurken, 57°C’de ölçülen değer daha yüksek olmuştur. % 0.15 askorbik asit oranına sahip örneklerde ise, 57°C (3.06 ± 0.62), 65°C (2.95 ± 0.67) ve 73°C (2.08 ± 0.32) seviyelerinde NDMA bulunmuştur. En düşük NDMA seviyesi 73°C’de ölçülmüş olup, 57°C ve 65°C grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Geleneksel domuz salamlarında N-nitrozamin seviyesinin belirlendiği bir çalışmada NDMA değeri 0.6 ± 0.1 µg/kg tespit edilmiştir (Gloria ve ark., 1997). Yurchenko ve Mölder (2007) yaptıkları bir çalışmada çeşitli et örneklerinin NDMA değerini ortalama 0.85 µg/kg düzeyinde tespit etmişlerdir. Rywotycki (2002), katkı maddesi ve ısıtma işlem uygulamasının domuz salami örneklerinde N-nitrozamin seviyelerine etkileri üzerinde çalışmış ve NDMA değerlerini 2.75-18,56 µg/kg aralığında tespit etmiştir. Çalışmada, askorbik asitin NDMA ve NDEA üzerinde inhibitör etki yaptığı buna karşın pastörizasyon uygulamasının ise söz konusu N-nitrozaminlerin oluşumunu artırdığı rapor edilmiştir.

Rywotycki (2007) yaptığı başka bir çalışmada, farklı çiğ ve pişirilmiş etlerde belirlediği NDMA değerlerini sırasıyla 1.68-12.00 µg/kg ve 2.10-16.67 µg/kg aralığında olduğunu bildirmiştir. Herrmann ve ark., (2015a) tarafından Belçika ve Danimarka piyasasından alınan örnekler üzerinde yapılan araştırmada, Danimarka kökenli salami ve pepperoni gibi fermente sosislerde maksimum NDMA değeri 4.0 µg/kg, ortalama değer ise 1.6 µg/kg olarak belirlenmiştir. Aynı araştırmada Belçika kökenli salami ve pepperoni ürünlerinde ise maksimum değer 7.2 µg/kg, ortalama değer ise 2.6 µg/kg olarak saptanmıştır.

Özbay (2020) tarafından farklı düzeyde askorbik asit uygulanmış sosisler üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük askorbik asit ilaveli sosislerde raf ömrü boyunca NDMA miktarı anlamlı ölçüde artmış, yüksek askorbik asit ilaveli sosislerde ise NDMA oluşumu sınırlanmış olup sonuçlar çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Isıl işlem görmüş sucuklarda askorbik asit, farklı oranlarda karabiber kullanımı ve pişirme sürelerinin N-nitrozaminler üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, askorbik asit oranlarındaki değişim NDMA üzerine etkisiz bulunurken karabiber oranlarındaki ve pişirme sürelerindeki artış NDMA üzerinde anlamlı yükselişe yol açmıştır (Sallan, 2020).

Pei-Shan (2024) tarafından yürütölen bir çalışmada ise kurutulmuş ve kürlenmiş sosislerde 7 günlük depolama sonunda NDMA oranındaki yükseliş, pişirme yöntemi kaynaklı yükselişten daha belirgin olmuştur.

Karaciğer ve kelle paa eti kullanılarak üretilmiş sosislerin N-nitrozaminler açısından değerlendirildiği başka bir çalışmada, taze örneklere nadiren düşük miktarlarda N-nitrozodimetilamin (NDMA) tespit edildiği, 72 saat boyunca 4-8°C’de depolama işlemi sonunda önemli ölçüde NDMA ve diğer N-nitrozamin türevlerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Domanska ve Kowalskg, 2002).

4.4. Nitrozopiperidin Miktarı

Farklı oranlarda askorbik asit ve ısıl işlem uygulanarak üretilen fermente sucukların NPIP değerleri izelge 4.4 ’te verilmiştir. Analiz edilen sucuklarda belirlenen NPIP değerleri 1.08-7.32 µg/kg aralığındadır. Isıl işlem derecesindeki artışa bağlı olarak NPIP seviyeleri daha yüksek değer almıştır. En yüksek NPIP değeri 1. formölasyon ve 65 °C ısıl işlem uygulanmış sucuklarda saptanmıştır. 2. formölasyon sucuklarında raf ömrü sonunda NPIP oranı 5 µg/kg değerinin üzerine çıkmıştır. 3. formölasyonda ise uygulanan ısıl işlem ve artan askorbik asit oranı NPIP üzerinde etkili olmuş ve raf ömrü sonunda 3.15–4.1 µg/kg arasında tespit edilmiştir.

Üretim ve depolama aşamaları boyunca NPIP seviyeleri önemli şekilde değişmiştir ($p<0.05$), bu da 1. ve 2. formölasyonda depolama sürecinde NPIP seviyelerinin belirgin şekilde arttığını göstermektedir. 3. formölasyon sucuklarında ise raf ömrü boyunca önemli bir fark görölmemektedir.

Çizelge 4.4. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma derecelerinin uygulanarak üretilen sucuklarda NPIP miktarı (µg/kg)

Askorbik asit oranı (%)	Isıl işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıl işlem	Olgunlaşma	Raf ömrü 30. gün	Raf ömrü 60. gün	Raf ömrü 90. gün	p ¹
		Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	
% 0.05	57°C		2.65 ± 0.51Bb	3.55 ± 0.56Cc	4.92 ± 0.63Dc	6.09 ± 0.83Ed	6.88 ± 0.35Fc	0.004**
	65°C	2.58 ± 0.5Ab	2.39 ± 0.4Ab	3.92 ± 1.04Bc	5.5 ± 0.95Cd	6.2 ± 0.73Dd	7.32 ± 0.34Ec	0.020*
	73°C		3.73 ± 0.4Ac	4.36 ± 0.65Bd	4.83 ± 0.7Bc	5.23 ± 0.17Cc	6.47 ± 1.07Dc	0.027*
%0.1	57°C		2.07 ± 0.35Ab	2.52 ± 0.37Bb	3.33 ± 0.45Cb	4.02 ± 0.34Db	4.8 ± 0.49Eb	0.005**
	65°C	2.2 ± 0.22Ab	2.18 ± 0.37Ab	3.49 ± 0.46Bc	4.04 ± 0.85Cc	4.7 ± 0.39Db	5.13 ± 0.18Eb	0.008**
	73°C		1.5 ± 0.37Aa	3.65 ± 0.58Cc	4.35 ± 0.53Dc	4.78 ± 0.34Db	5.19 ± 0.45Eb	0.005**
% 0.15	57°C		1.25 ± 0.17Aa	1.48 ± 0.48Aa	2.14 ± 0.16Ba	3.15 ± 0.66Ca	3.15 ± 0.57Ca	0.030*
	65°C	1.6 ± 0.44Bb	1.08 ± 0.09Aa	2.54 ± 0.4Bb	3.15 ± 0.66Cb	3.25 ± 0.66Ca	3.66 ± 1.02Ca	0.045*
	73°C		1.49 ± 0.39Aa	1.81 ± 0.62Ba	2.95 ± 0.75Cb	3.44 ± 0.38Da	4.1 ± 0.62Ea	0.014*
p ²		0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

Etkileşim Ölçüm **p=0.000****; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı **p=0.000****; Ölçüm×Isıl İşlem Derecesi $p=0.229$; ÖA×AAO×İİD **p=0.003****

* $p<0.05$; ** $p<0.01$. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

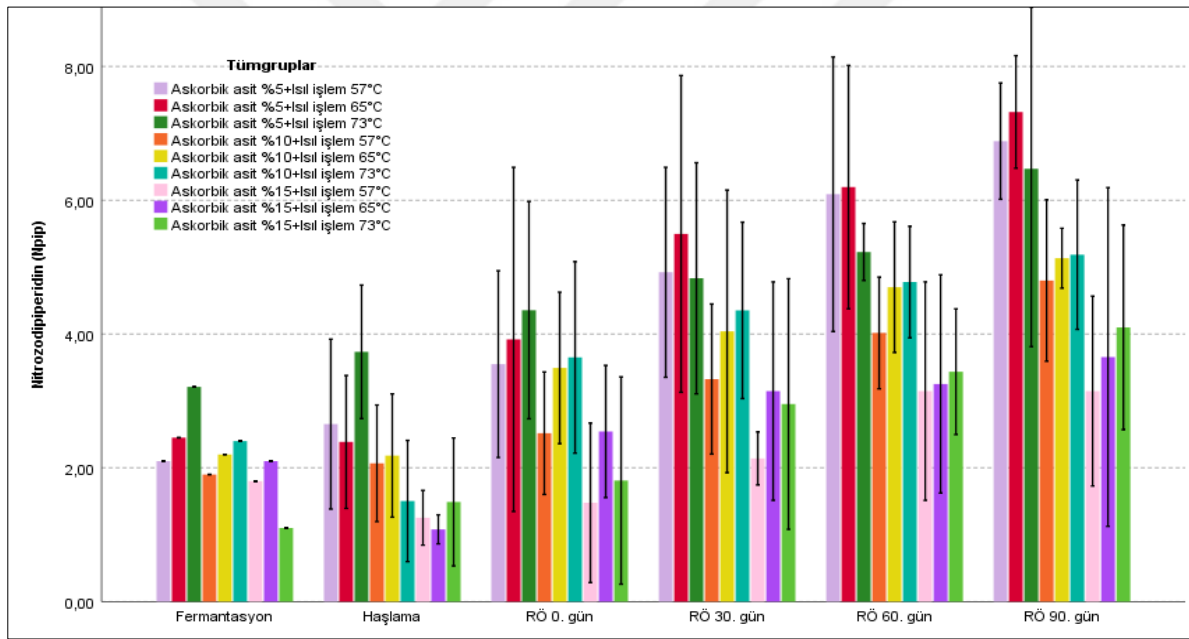
Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA)

Üretim ve depolama süreci ile askorbik asit oranlarının birlikte etkisi de anlamlıdır ($p<0.05$). Daha yüksek askorbik asit oranlarında (%0.15), NPIP oluşumu başlangıçta daha düşük seviyelerde kalmış ve depolama süreci boyunca belirli bir artış göstermemiştir. Düşük askorbik asit oranlarında (%0.05 ve %0.1) ise depolama sürecinde NPIP seviyelerinin daha hızlı yükseldiği belirlenmiştir.

Askorbik asit oranları, ısıtılma işlem parametreleri ve depolama sürecinin üçlü etkisi incelendiğinde, NPIP oluşumunun zaman, sıcaklık ve askorbik asit oranının birleşik etkisiyle değiştiğini görülmektedir ($p<0.05$). Özellikle düşük askorbik asit oranlarında ve yüksek sıcaklıklarda NPIP seviyelerinin zamanla hızla arttığı belirlenmiştir. Ancak, yüksek askorbik asit oranı (özellikle % 0.15), NPIP artışını belirgin şekilde baskılamıştır.



Şekil 4.2. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtılma derecelerinin üretim ve depolama süresince NPIP oluşumu üzerine etkileri

Fermentasyon aşaması sonuçları incelendiğinde, % 0.05 askorbik asit uygulanmış örneklerde NPIP, 2.58 ± 0.5 ile en yüksek değere ulaşırken, % 0.1 askorbik asit oranında, 2.2 ± 0.22 ve % 0.15 askorbik asit uygulaması ile 1.6 ± 0.44 değerleri elde edilmiştir. Fermentasyon aşamasında NPIP oranları arasındaki fark, istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Isıl işlem aşamasındaki sonuçlara bakıldığında, % 0.05 askorbik asit oranında, ısıtma işlem sonrası NPIP seviyeleri 57°C’de (2.65 ± 0.51), 65°C’de (2.39 ± 0.4) ve 73°C’de (3.73 ± 0.4) olarak belirlenmiştir. Sıcaklık arttıkça NPIP seviyelerinde artış görülmektedir. % 0.1 askorbik asit oranında, ısıtma işlem değerleri 57°C’de (2.07 ± 0.35), 65°C’de (2.18 ± 0.37) ve 73°C’de (1.5 ± 0.37) olarak ölçülmüştür. % 0.15 askorbik asit oranında, NPIP seviyeleri 57°C’de (1.25 ± 0.17), 65°C’de (1.08 ± 0.09) ve 73°C’de (1.49 ± 0.39) seviyelerinde kalmış ve ısıtma işlem uygulamalarının anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Bu durum, yüksek askorbik asit oranının NPIP oluşumunu ısıtma işlem sürecinde baskılayabildiğini göstermektedir.

Olgunlaşma süreci sonunda, 1. formülasyon sucuk örneklerinde NPIP seviyeleri 57°C’de (3.55 ± 0.56), 65°C’de (3.92 ± 1.04) ve 73°C’de (4.36 ± 0.65) olarak belirlenmiş olup, sıcaklık arttıkça NPIP oluşumunun da arttığı gözlemlenmiştir. 2. formülasyon örneklerin NPIP seviyeleri 57°C’de (2.52 ± 0.37), 65°C’de (3.49 ± 0.46) ve 73°C’de (3.65 ± 0.58) olarak belirlenmiştir. Isıtma işlem derecesinin artmasıyla NPIP seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. % 0.15 askorbik asit oranına sahip 3. formülasyon sucuk örneklerinde ise 57°C 65°C ve 73°C arasında belirgin bir fark bulunmamış, NPIP seviyeleri (1.48 ± 0.48 , 2.54 ± 0.4 ve 1.81 ± 0.62) seviyelerinde kalmıştır. Bu durum, yüksek askorbik asit oranının NPIP oluşumunu sınırladığını göstermektedir.

Raf ömrünün 30. günündeki analiz sonuçlarına bakıldığında, %0.05 askorbik asit ilaveli 1. formülasyonda, raf ömrü 30. gün itibariyle NPIP seviyeleri 57°C’de (4.92 ± 0.63), 65°C’de (5.5 ± 0.95) ve 73°C’de (4.83 ± 0.7) olarak elde edilmiştir. 2. formülasyon NPIP seviyeleri 57°C’de (3.33 ± 0.45), 65°C’de (4.04 ± 0.85) ve 73°C’de (4.35 ± 0.53) seviyelerinde gözlenmiştir. 3. formülasyon, NPIP seviyeleri 57°C’de (2.14 ± 0.16), 65°C’de (3.15 ± 0.66) ve 73°C’de (2.95 ± 0.75) seviyelerinde olup, 65°C’de anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Raf ömrünün 60. gün ölçümlerinde ise, 1. formülasyon NPIP seviyeleri 57°C’de (6.09 ± 0.83), 65°C’de (6.2 ± 0.73) ve 73°C’de (5.23 ± 0.17) seviyelerinde olup, 73°C’de anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur. 2. formülasyon NPIP seviyeleri 57°C’de (4.02 ± 0.34), 65°C’de (4.7 ± 0.39) ve 73°C’de (4.78 ± 0.34) seviyelerinde olup, tüm sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

3. formülasyon örneklerde ise, NPIP seviyeleri 57°C’de (3.15 ± 0.66), 65°C’de (3.25 ± 0.66) ve 73°C’de (3.44 ± 0.38) seviyelerinde olup, sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Raf ömrünün 90. gününde ise 1. formülasyon NPIP seviyeleri, 57°C’de (6.88 ± 0.35), 65°C’de (7.32 ± 0.34) ve 73°C’de (6.47 ± 1.07) seviyelerinde kalmıştır. % 0.1 askorbik asit oranına sahip 2. formülasyonda, NPIP seviyeleri 57°C’de (4.8 ± 0.49), 65°C’de (5.13 ± 0.18) ve 73°C’de (5.19 ± 0.45) seviyelerinde olup, 65°C ve 73°C grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. % 0.15 askorbik asit oranına sahip 3. formülasyon örneklerde ise, NPIP seviyeleri 57°C’de (3.15 ± 0.57), 65°C’de (3.66 ± 1.02) ve 73°C’de (4.1 ± 0.62) olarak en düşük seviyede kalmıştır.

Salami gibi fermente sosislerin pek çok türünde karabiber kullanılmasından dolayı sıklıkla NPIP saptanmaktadır (Herrmann ve ark. 2015b). De Mey ve ark., (2014b) tarafından yapılan bir çalışmada pepper salami olarak adlandırılan fermente bir sosis çeşidinde toplam N-nitrozamin seviyesi 14.0 µg/kg olarak belirlenmiş ve NPIP seviyesi ise 12.3 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca karabiberin piperin içermesinden dolayı NPIP oluşumu için gerekli piperidin döngüsüne katkıda bulunabileceği de belirtilmiştir.

Sallan (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada, fermente sucuklar üzerinde hem askorbik asit kullanım konsantrasyonu arttıkça hem de bu artışın pişirme süresindeki artış ile ikili etkileşiminin NPIP üzerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalışa yol açtığı bildirilmiştir.

Sosis üretiminde farklı askorbik oranları ve depolamanın N-nitrozaminler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, NPIP oranlarını depolamanın son gününde 9.87 µg/kg ile düşük askorbik asitli üretimde tespit ederken muhafazanın son gününde yüksek askorbik asit ilaveli örneklerde 5.23 µg/kg NPIP içeriği saptanmıştır. NPIP oluşumu ile askorbik asit oranları ve depolama süreci arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Özbay, 2022). Araştırmacının elde ettiği bu sonuçlar çalışmamız ile benzerdir.

4.5. Nitrozopirolidin Miktarı

Farklı oranlarda askorbik asit kullanılarak ve ısıtıl işlem uygulanarak üretilen fermente sucukların NPYR değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, fermentasyon ve ısıtıl işlem aşamalarında NPYR oluşumu gözlenmemiştir. Düşük oranda askorbik asit kullanılan örneklerde 90. gün sonunda 1.01-1.67 µg/kg arasında NPYR oluşmuştur. % 0.15 oranında askorbik asit kullanılan örneklerde ise NPYR oranı 1.0 µg/kg’ın altında kalmıştır.

Üretim aşamaları ve depolama süreçleri boyunca NPYR miktarları önemli ölçüde artmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, NPYR seviyelerinin zaman içinde anlamlı değişimler gösterdiğini, özellikle depolama sürecinde önemli bir artış gözlemlendiğini göstermektedir. Başlangıçta (fermentasyon ve ısıtıl işlem aşamalarında) NPYR seviyeleri sıfır veya çok düşük iken, ilerleyen günlerde özellikle raf ömrü 90. güne kadar belirgin bir yükseliş gözlenmiştir.

Üretim aşamaları ve depolama süreci ile askorbik asit oranı arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, askorbik asit oranının zaman içinde NPYR oluşumu üzerindeki etkisinin önemli olduğunu göstermektedir. Genel olarak yüksek askorbik asit oranlarına sahip gruplarda NPYR seviyeleri daha düşük kalmıştır. Ancak, düşük askorbik asit oranlarına sahip gruplarda NPYR seviyelerinin zamanla arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, askorbik asidin NPYR oluşumunu baskılayıcı etkisini desteklemektedir.

Farklı askorbik asit oranları ve ısıtıl işlem derecelerinin fermentasyon, ısıtıl işlem ve raf ömrü boyunca Nitrozopirolidin (NPYR) oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde, her biri farklı kombinasyonlardan oluşan toplam 9 grubun % 0.15 askorbik asit 73°C grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.5. Farklı askorbik asit oranları ve ısıt işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NPYR miktarı (µg/kg)

Askorbik asit oranı (%)	Isıl işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıl İşlem	Olgunlaşma	Raf Ömrü 30. gün	Raf Ömrü 60. gün	Raf Ömrü 90. gün	p ¹
		Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	
% 0.05	57°C		0 ± 0Aa	0.87 ± 0.05Bb	0.95 ± 0.14Ba	1.13 ± 0.17Bb	1.47 ± 0.44Cc	0.018*
	65°C	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.72 ± 0.1Bb	0.82 ± 0.1Ba	0.96 ± 0.15Bb	1.01 ± 0.22Ba	0.004**
	73°C		0 ± 0Aa	0.32 ± 0.09Bb	0.93 ± 0.19Ca	0.8 ± 0.34Cb	1.67 ± 0.38Dc	0.007**
%0.1	57°C		0 ± 0Aa	0.5 ± 0.17Bb	0.99 ± 0.41Ca	1.11 ± 0.46Cb	1.31 ± 0.42Db	0.002**
	65°C	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	1.02 ± 0.32Bc	1.2 ± 0.46Ba	1.4 ± 0.41Cc	1.5 ± 0.35Cc	0.011*
	73°C		0 ± 0Aa	0.53 ± 0.15Bb	0.77 ± 0.28Ba	0.78 ± 0.35Bb	1.43 ± 0.12Cc	0.024*
% 0.15	57°C		0 ± 0Aa	0.55 ± 0.48Bb	0.84 ± 0.21Ba	0.47 ± 0.11Ba	0.66 ± 0.08Ba	0.001*
	65°C	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	1.22 ± 0.36Ca	0.51 ± 0.24Ba	0.84 ± 0.21Ba	0.014*
	73°C		0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.8 ± 0.31Ba	0.9 ± 0.21Bb	0.97 ± 0.2Ba	0.014*
p ²		1.00	1.00	0.000**	0.50	0.024*	0.006**	

Etkileşim Ölçüm **p=0.000****; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı **p=0.000****; Ölçüm×Isıl İşlem Derecesi **p=0.023***; ÖA×AAO×İİD **p=.,013***

*p<0.05; **p<0.01. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

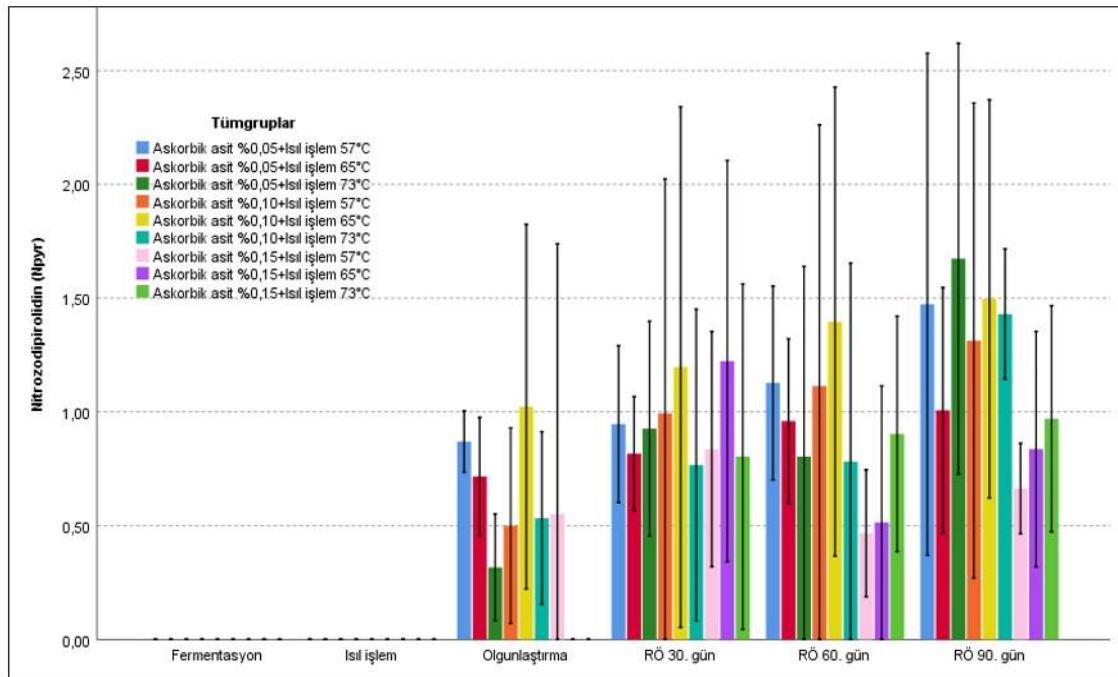
p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

Fermantasyon sürecinde, tüm gruplarda (% 0.05, %0.1, %0.15 askorbik asit oranlarında) fermantasyon aşamasında NPYR oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuç, fermantasyon sürecinde NPYR oluşumunun başlamadığını ve askorbik asidin bu aşamada oluşumu engellediğini düşündürmektedir.

Isıl işlem sürecindeki değişimler incelendiğinde, tüm gruplarda ısıl işlem aşamasında da NPYR oluşumu gözlenmemiştir. Bu durum, ısıl işlemin bu aşamada NPYR oluşumu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Olgunlaşmasını tamamlamış örneklerin sonuçları incelendiğinde %0.05 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C arasında anlamlı bir fark bulunmamış, NPYR seviyeleri sırasıyla (0.87 ± 0.05), (0.72 ± 0.1) ve (0.32 ± 0.1) olarak belirlenmiştir. % 0.1 ve % 0.15 askorbik asit oranlarında, ısıl işlem uygulamalarının tamamında NPYR oluşumu gözlenmemiştir, bu da askorbik asit oranının yüksek olduğu gruplarda NPYR oluşumunun engellendiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince NPYR oluşumu üzerine etkileri

Sucuk örneklerinin raf ömrünün 30. gün ölçümlerinde, %0.05 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.95 ± 0.14), 65°C’de (0.82 ± 0.1) ve 73°C’de (0.93 ± 0.19) seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). %0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.99 ± 0.41), 65°C’de (1.2 ± 0.46) ve 73°C’de (0.77 ± 0.28) seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C’de (0.84 ± 0.21 , 1.22 ± 0.36 ve 0.8 ± 0.31) seviyelerinde olup, gruplar arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Genel olarak, 30. gün itibariyle tüm gruplarda NPYR oluşumunun devam ettiği ancak belirgin bir farklılık oluşmadığı gözlemlenmiştir.

Raf ömrünün 60. gün analiz sonuçlarına bakıldığında, % 0.05 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.13 ± 0.17), 65°C’de (0.96 ± 0.15) ve 73°C’de (0.8 ± 0.34) seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmuştur. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.11 ± 0.46), 65°C’de (1.4 ± 0.41) ve 73°C’de (0.78 ± 0.35) seviyelerinde olup, özellikle 65°C’de artış gözlenmiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.47 ± 0.11), 65°C’de (0.51 ± 0.24) ve 73°C’de (0.9 ± 0.21) seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Raf ömrünün 90. gün ölçümlerinde %0.05 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.47 ± 0.44), 65°C’de (1.01 ± 0.22) ve 73°C’de (1.67 ± 0.38) seviyelerinde anlamlı fark bulunmuştur. %0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.31 ± 0.42), 65°C’de (1.5 ± 0.35) ve 73°C’de (1.43 ± 0.12) seviyelerinde olup, tüm sıcaklıklarda artış gözlenmiştir. %0.15 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.66 ± 0.08), 65°C’de (0.84 ± 0.21) ve 73°C’de (0.97 ± 0.2) seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Genel olarak, 90. gün itibariyle en yüksek NPYR seviyeleri % 0.05 askorbik asit oranında gözlenirken, % 0.15 askorbik asit oranında en düşük seviyeler korunmuştur.

Sallan (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada, fermente sucuk örneklerinde sodyum askorbat kullanımı NPYR değerlerinde düşüşe yol açmıştır. Askorbat kullanılmadan üretilen örneklerde 14.31 ± 8.72 µg/kg olarak belirlenen ortalama NPYR değeri, sodyum askorbat kullanıldığında 12.79 ± 7.28 µg/kg değerine düşmüştür ancak farklılık istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

Depolama süreci, askorbik asit oranı ve ısıtma işlem derecesinin NPYR oluşumu üzerindeki üçlü etkisi anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulgu, NPYR oluşumunun yalnızca tek bir faktöre bağlı olmadığını, aksine zaman, sıcaklık ve askorbik asit oranının etkileşimiyle birlikte şekillendiğini göstermektedir. Özellikle yüksek askorbik asit içeren gruplarda, belirli sıcaklık seviyelerinde ve belirli zaman dilimlerinde NPYR oluşumunun daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, askorbik asit oranı düşük olan gruplarda yüksek sıcaklık ve uzun süreli depolamanın NPYR seviyelerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Prolin ve pirolidinin NPYR oluşumunda öncül maddeler olduğu belirtilmektedir (Drabik-Markiewicz ve ark., 2010). Prolin, hidrofobik yapıda aminoasittir. Hidroksiprolin ise sahip olduğu hidroksil grubu sebebiyle proline göre daha hidrofiliktir. NPYR oluşumu üzerinde daha hidrofobik olan prolin, hidroksiprolinle kıyaslandığında NPYR öncül maddesi olarak daha büyük bir etkiye sahip olduğu, hidroksiprolinin NPYR oluşumunda inhibitör etki yaptığı belirtilmektedir (Drabik-Markiewicz ve ark. 2009). Drabik-Markiewicz ve ark. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada, NPYR oluşumunda pirolidinin öncül madde olarak prolinden daha büyük etkiye sahip olduğu tekrar bildirilmiştir.

Pirinççi ve ark., (1986), Türkiye piyasasında satışa sunulmuş 21 farklı sucuk örneği üzerine yaptıkları araştırmada tüm numunelerde NPYR tespit ederken, Li ve ark., (2012) NPYR'nin işlem görmüş et ürünlerinde en sık rastlanan N-nitrozamin türü olduğunu ve askorbik asit ilave edilmiş kuru kürlenmiş sosis numunelerinde NPYR'nin askorbik asitten istatistiki olarak anlamlı şekilde etkilendiğini ve olgunlaştırma sürecinde miktarının artış gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Yürchenko ve Mölder (2007) yürüttükleri çalışmada 2001-2005 yılları arasında topladıkları çiğ, kızarmış, tütsülenmiş, konserve edilmiş et ürünlerinin %90'ında NPYR tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Özbay (2022) farklı askorbik asit ilave edilmiş sosis örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada ise NPYR'nin askorbik asit ilavesinden önemli ölçüde etkilendiğini depolama süresince sosis örneklerinin NPYR içeriğinin önemli ölçüde değişmediğini rapor etmiştir.

4.6. Nitrozodietilamin Miktarı

Araştırmamızda farklı oranlarda askorbik asit kullanılarak ve ısıt işlem uygulanarak üretilen fermente sucukların saptanan NDEA değeri Çizelge 4.6' da verilmiştir. Sucuk örneklerinde olgunlaştırma işleminden raf ömrü sonuna kadar belirlenen NDEA değeri 0.16-4.21 µg/kg aralığında değişim göstermiştir. Uygulanan ısıt işlem derecesine bağlı olarak NDEA seviyeleri daha yüksek seyretmiş ancak askorbik asit artışı NDEA oranlarında azalış sağlamıştır.

En yüksek NDEA değeri 1. formülasyon ile üretilen ve 75°C ısıt işlem uygulanmış sucuklarda saptanmıştır. Bu örneklerde 90. günün sonunda NDEA oranı 4.21 µg/kg olarak saptanmıştır, % 0.15 askorbik asitli 3. formülasyonda ise uygulanan ısıt işlem NDEA üzerinde etkili olmuş ve NDEA oranları 2 µg/kg' ın altında kalmıştır. Tüm örneklerde askorbik asit NDMA üzerinde azaltıcı etki göstermiş buna karşın uygulanan ısıt işlem fermentasyon ve raf ömrü boyunca depolama aşamaları NDEA miktarını artırmıştır.

Üretim süreci ve depolama boyunca NDEA seviyeleri anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$), Başlangıçta (fermantasyon ve ısıt işlem aşamalarında) düşük seviyelerde olan NDEA, özellikle raf ömrü 90. güne kadar artış göstermiştir.

Üretim aşamaları ve depolama ile askorbik asit oranının NDEA oluşumu üzerindeki ikili etkileşim de önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Daha yüksek askorbik asit oranları (% 0.15) başlangıçta NDEA oluşumunu baskılayarak, zamanla artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, düşük askorbik asit oranlarında (% 0.5 ve % 0.10) depolama süreci boyunca NDEA seviyelerinin daha hızlı yükseldiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDEA miktarı (µg/kg)

Askorbik asit oranı (%)	Isıtma işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıtma işlem	Olgunlaştırma	Raf Ömrü 30. gün	Raf Ömrü 60. gün	Raf Ömrü 90. gün	p ¹
		Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	
% 0.05	57°C		0.33 ± 0.06Ba	0 ± 0Aa	1.41 ± 0.17Cb	1.55 ± 0.12Cb	1.72 ± 0.14Db	0.000**
	65°C	0.50 ± 0.08Ab	0.75 ± 0.1Ab	0.74 ± 0.07Ac	1.51 ± 0.17Bb	2.12 ± 0.2Cc	3.87 ± 0.53Dd	0.008**
	73°C		1.11 ± 0.31Bc	0.61 ± 0.07Ac	2.54 ± 0.21Cc	3.27 ± 0.16Dd	4.21 ± 0.75Ee	0.019*
% 0.1	57°C		1.11 ± 0.31Bc	0.33 ± 0.05Ab	1.41 ± 0.17Cb	1.51 ± 0.17Cb	1.9 ± 0.46Db	0.007**
	65°C	0.37 ± 0.07Aa	1.5 ± 0.28Cd	0.75 ± 0.05Ac	1.11 ± 0.16Bb	1.63 ± 0.06Cb	2.49 ± 0.34Dc	0.013*
	73°C		1.28 ± 0.31Bc	0.8 ± 0.56Cc	1.31 ± 0.17Bb	2.07 ± 0.28Cc	2.66 ± 0.21Dc	0.004**
% 0.15	57°C		0.17 ± 0.06Aa	0.49 ± 0.07Ab	0.63 ± 0.07Aa	0.75 ± 0.05Ba	0.99 ± 0.14Ca	0.009**
	65°C	0.28 ± 0.05Aa	0.16 ± 0.05Aa	0.22 ± 0.05Ab	0.53 ± 0.09Ba	1.47 ± 0.21Cb	1.82 ± 0.18Db	0.005**
	73°C		0.28 ± 0.06Aa	0.28 ± 0.09Ab	0.44 ± 0.05Ba	1 ± 0.13Ca	1.86 ± 0.13Db	0.004**
p ²		0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

Etkileşim Ölçüm^p=**0.000****; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı^p=**0.000****; Ölçüm×Isıtma İşlem Derecesi^p=**0.000****; ÖA×AAO×İİD^p=**0.000****

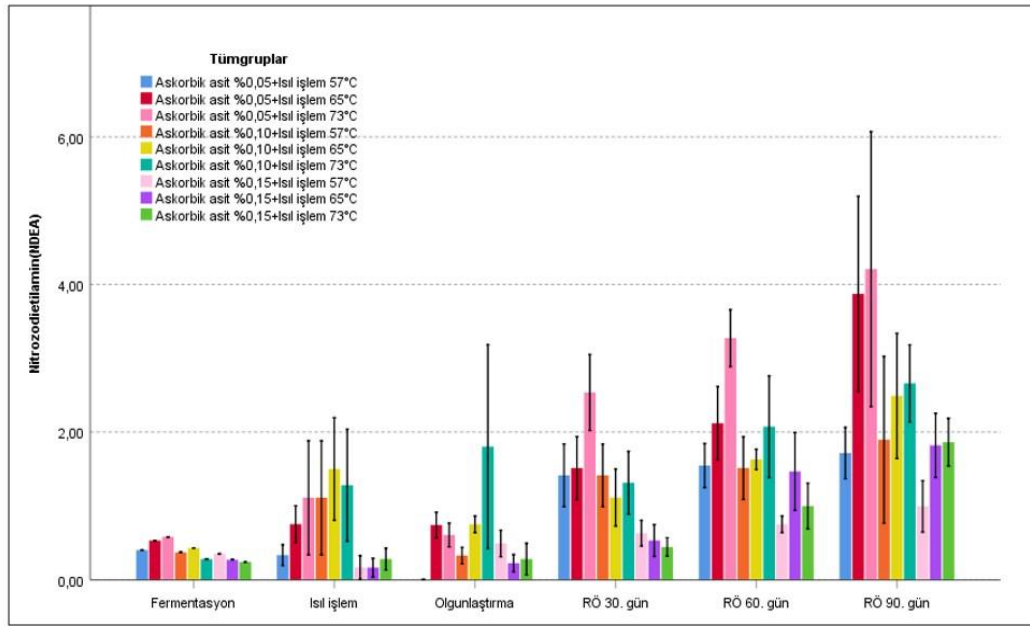
*p<0.05; **p<0.01. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

Depolama süreci, askorbik asit ve ısıtma işlem derecelerinin üçlü etkisi de NDEA üzerinde anlamlı etkiye yol açmıştır. NDEA oluşumunun yalnızca zaman veya sıcaklık gibi tekil faktörlere bağlı olmadığını, bu 3 faktörün birlikte etkileşim halinde olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). Düşük askorbik asit oranlarında (% 0.05 ve % 0.1) ve yüksek sıcaklıklarda (65°C ve 73°C) NDEA seviyelerinin daha hızlı arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, % 0.15 askorbik asit oranı içeren gruplarda NDEA artışı daha sınırlı kalmıştır.



Şekil 4.4. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince NDEA oluşumu üzerine etkileri

Fermentasyon sürecinde askorbik asit oranına bağlı olarak NDEA seviyelerinde farklılıklar gözlenmiştir. 1. formülasyonda (0.5 ± 0.08) tespit edilirken, yüksek askorbik asit oranında NDEA oranı düşmüş ancak 2. ve 3. formülasyonlar arasındaki fark önemsiz çıkmıştır.

Olgunlaştırma aşaması sonuçlarına bakıldığında; % 0.1 askorbik asit oranında, 73°C’de en yüksek NDEA seviyesi ölçülmüştür (0.8 ± 0.56) % 0.10 ve % 0.15 askorbik asitli örneklerde, sıcaklık arttıkça NDEA seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ve tüm gruplar benzer seviyelerde kalmıştır.

Sucuk numunelerinin raf ömrünün 30. gününde, % 0.05 askorbik asit oranında, 57°C ve 73°C grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 65°C’de değer biraz daha düşük tespit edilmiştir (1.51 ± 0.17). % 0.1 ve % 0.15 oranlarında, düşük sıcaklıklarda daha düşük NDEA seviyeleri korunmuşken (1.11 ± 0.16), 73°C ısıtıl işlem uygulanmış örneklerde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

Örneklerin depolama sürecinin 60. gün ölçümlerinde, % 0.05 askorbik asit oranına sahip 1. formülasyonda 65°C’de en yüksek değer ölçülmüş (2.12 ± 0.2), 57°C ve 73°C’de bu değerler nispeten daha düşük kalmıştır (1.55 ± 0.12 , 3.27 ± 0.16). 2. formülasyonda, 65°C’de nispeten yüksek NDEA seviyesi saptanmış (1.63 ± 0.06), 57°C’de ise en düşük seviye kaydedilmiştir (1.51 ± 0.17). % 0.15 grubunda, sıcaklığa bağlı olarak belirgin farklılıklar gözlenmiş, 57°C ve 65°C’de düşük seviyeler korunurken, 73°C’lik ısıtıl işlem uygulamasında NDEA seviyesinde artış kaydedilmiştir (1.00 ± 0.13).

Raf ömrü 90. gün ölçümlerinde ise, %0.05 askorbik asit oranına sahip 1.formülasyonda, 73°C’ ısıtıl işlem uygulanmış örneklerde en yüksek değer bulunmuş (4.21 ± 0.75), tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. 2. formülasyon grubunda, sıcaklık arttıkça NDEA seviyesi yükselmiş ve 65°C ile 73°C’de en yüksek değerlere ulaşılmıştır (2.49 ± 0.34 ve 2.66 ± 0.21). % 0.15 grubunda, en düşük seviyeler 65°C’de (1.82 ± 0.18) ve 73°C’de (1.86 ± 0.13) bulunmuş, ancak 57°C grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlenmiştir.

Rywotycki (2002) tarafından model sistem ile yürütülen bir çalışmada, sodyum klorür ve sodyum askorbatın NDMA ve NDEA oluşumunda inhibitör olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Özel ve ark., (2010) Türkiye piyasasında satışa sunulmuş olan, salam, sucuk ve döner içeren 22 farklı et ürününün toplam uçucu N-nitrozaminkonsantrasyonlarını $0.45-16.63 \mu\text{g/kg}$ seviyesinde tespit etmişlerdir. Araştırmacılar en yüksek seviyede N-nitrozamin oluşumunun dönerde gerçekleştiğini ve et ürünlerinde genel olarak NDMA ve NDEA türevlerine rastlandığını bildirmişlerdir. Bu çalışma, nitrit-nitrat tuzu ilave edilmeden üretilen et ürünlerinde de N-nitrozamin oluşabileceğini göstermektedir.

Farklı oranlarda askorbik asit ilave edilmiş sosislerde N-nitrozamin içeriklerinin araştırıldığı bir çalışmada, ısıtılma aşamasında NDEA oluşumunun istatistikî olarak önemli bulunduğu ve raf ömrü boyunca artış miktarının askorbik asit oranından önemli ölçüde etkilendiğini bildirilmiştir (Özby, 2020).

Lu ve ark., (2023) tarafından kuru kürlenmiş sosisler üzerinde yürütölen bir çalışmada uygulanan sıcaklığın NDMA ve NDEA oluşumuna olan etkileri araştırılmıştır. NDMA seviyesi 70 °C'de 3.68 µg/kg iken sıcaklık 130 °C'ye çıktığında 6.41 µg/kg'a çıkmıştır, bu da işleme sıcaklığının NDMA artışına yol açabileceğini göstermektedir. Yüksek sıcaklık uygulamasının nitrozasyon için gereken aktivasyon enerjisini sağlayabileceğı belirtilmiştir

Güney Kore pazarından temin edilen sosis örneklerinin N-nitrozaminler yönünden araştırıldığı bir çalışmada, NDEA içerikleri 0.89–2.53 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. Ancak, NDMA seviyeleri fermente edilmiş iki sosis örneğinde, fermente edilmemiş sosislere göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$), bu da fermente edilmiş sosislerin NDMA içeriğini diğer sosis örneklerine göre daha yüksek bulan Scheeren ve ark.'nın (2015) çalışması ve bizim çalışmamızın bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

4.7. Nitrozodibütilamin Miktarı

Farklı oranlarda askorbik asit kullanılarak ve ısıtılma uygulanarak üretilen fermente sucukların NDBA değeri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Analiz edilen sucuklarda belirlenen NDBA değeri 0.00-4.57 µg/kg aralığındadır. Askorbik asit oranındaki artış ile NDBA seviyeleri daha düşük değeri almıştır. En yüksek NDBA değeri 1. formülasyon ile üretilen sucuklarda depolamanın 90. gününde saptanmıştır. Yüksek oranda askorbik asit ilaveli 2. ve 3. formülasyonlarda, olgunlaşma süreci sonunda NDBA değeri 1 µg/kg' ın altında kalmıştır.

Üretim aşamaları ve depolama süreci ile NDBA seviyeleri arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuç, NDBA seviyelerinin zaman içinde belirgin değışiklikler gösterdiğini ve özellikle depolama sürecinde artış eğiliminde olduğunu göstermektedir. Başlangıçta (fermantasyon ve ısıtılma aşamalarında) NDBA seviyeleri genellikle düşük veya sıfır iken, depolama sürecinde belirgin bir yükseliş gözlenmiştir.

Üretim aşamaları ve depolama süreci ile askorbik asit oranı arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, askorbik asit oranının NDBA oluşumu üzerindeki etkisinin önemli olduğunu ve zaman ilerledikçe bu etkinin sürdüğünü göstermektedir. Daha yüksek askorbik asit oranlarında (% 0.15), NDBA seviyelerinin daha düşük olduğu, ancak düşük askorbik asit oranlarında (%0.5 ve % 0.1) NDBA seviyelerinin zamanla arttığı gözlemlenmiştir.

Üretim aşamaları ve depolama süreci ile askorbik asit oranı ve ısıtma işlem derecesinin üçlü etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, NDBA oluşumunun yalnızca zaman veya sıcaklık gibi tekil faktörlere bağlı olmadığını, aksine bu üç faktörün birlikte etkileşim halinde olduğunu göstermektedir. Özellikle düşük askorbik asit oranlarında ve belirli sıcaklıklarda NDBA seviyelerinin zamanla arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, yüksek askorbik asit oranlarında NDBA seviyeleri baskılanmış ve 90. gün itibarıyla bile düşük kalmıştır.

Fermantasyon sürecinde, % 0.05 askorbik asit oranında en yüksek NDBA değeri tespit edilirken, % 0.1 askorbik asit oranında azalma görülmüş ve % 0.15 askorbik asit oranında NDBA oluşumu gözlenmemiştir.

Isıtma işlem aşamasında, % 0.05 askorbik asit oranına sahip 1. formülasyon örneklerde sıcaklık arttıkça azalma görülmüş, 57°C’de (1.7 ± 0.44) en yüksek, 73°C’de (1.1 ± 0.23) en düşük değer elde edilmiştir. % 0.1 askorbik asit oranında, 65°C’de (1.7 ± 0.53) en yüksek değer gözlemlenirken, 73°C’de (0.33 ± 0.09) en düşük seviyeye inmiştir. % 0.15 askorbik asit oranına sahip 3. formülasyon örneklerde ise, NDBA oranlarında azalma eğilimi gözlenmiş ancak uygulanan sıcaklık derecelerinin belirgin bir fark oluşturmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.7. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem dereceleri uygulanmış ısıtma işlem görmüş sucuklarda NDBA miktarı (µg/kg).

Askorbik asit oranı (%)	Isıtma işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıtma işlem	Olgunlaşma	RAF ÖMRÜ 30. gün	RAF ÖMRÜ 60. gün	RAF ÖMRÜ 90. gün	p ¹
		Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	
% 0.05	57°C		1.7 ± 0.44Bd	1.03 ± 0.18Aa	1.72 ± 0.44Bb	1.64 ± 0.34Ba	2.34 ± 0.35Cb	0.003**
	65°C	1.36 ± 0.45Ac	1.44 ± 0.29Ac	1.17 ± 0.4Aa	1.58 ± 0.38Bb	2.45 ± 0.37Cc	3.38 ± 0.27Dc	0.000**
	73°C		1.1 ± 0.23Ab	2.03 ± 0.18Ba	1.77 ± 0.4Bb	2.16 ± 0.41Bb	4.57 ± 1.16Cd	0.007**
%0.1	57°C		0.89 ± 0.22Ab	0.79 ± 0.17Aa	1.02 ± 0.18Ab	1.22 ± 0.44Ba	2.34 ± 0.46Cb	0.005**
	65°C	0.77 ± 0.1Ab	1.7 ± 0.53Bd	1.78 ± 0.47Bb	1.99 ± 0.42Cc	2.58 ± 0.25Dc	3.15 ± 0.27Ec	0.008**
	73°C		0.33 ± 0.09Aa	0.83 ± 0.12Aa	1.33 ± 0.47Bb	2.15 ± 0.36Cb	2.52 ± 0.5Db	0.003**
% 0.15	57°C		0.74 ± 0.08Bb	1.1 ± 0.28Ba	0.76 ± 0.13Ba	1.59 ± 0.81Ca	3.08 ± 0.44Dc	0.003**
	65°C	0.00 ± 0.00Aa	0.62 ± 0.11Bb	0.78 ± 0.3Ba	1.44 ± 0.51Cb	1.47 ± 0.37Ca	1.68 ± 0.85Da	0.012*
	73°C		0.92 ± 0.26Bb	0.96 ± 0.22Ba	1.57 ± 0.51Cb	1.55 ± 0.58Ca	2 ± 0.51Db	0.005**
p ²		0.000**	0.000**	0.000**	0.036*	0.019*	0.001**	

Etkileşim Ölçüm $p=0.000^{**}$; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı $p=0.015^{*}$; Ölçüm×Isıtma İşlem Derecesi $p=0.007^{**}$; ÖA×AAO×İİD $p=0.000^{**}$

* $p<0.05$; ** $p<.,01$. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

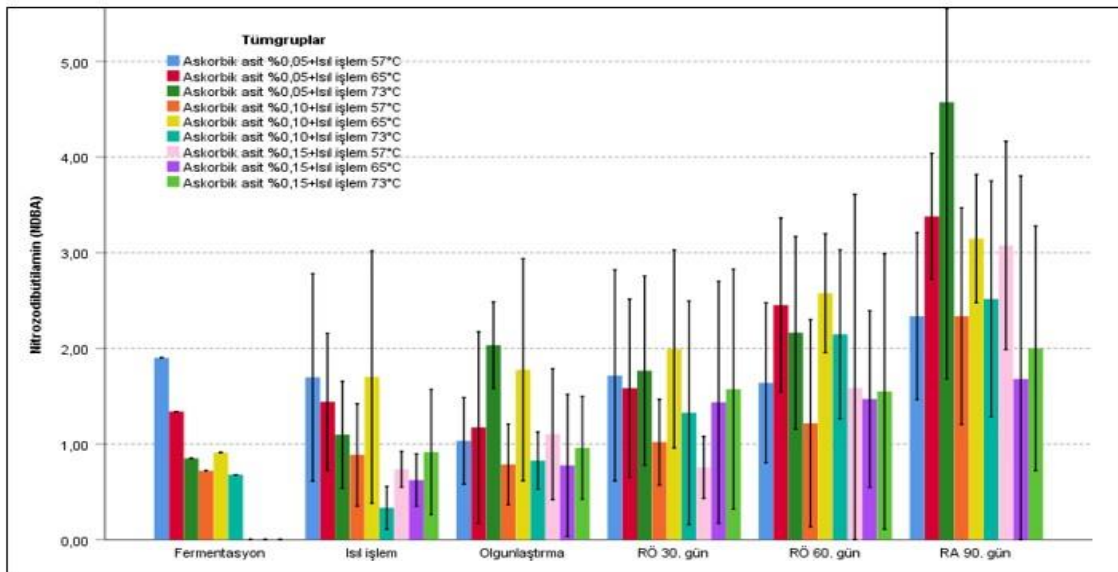
p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

Olgunlaşmasını tamamlamış sucuk numuneleri incelendiğinde, % 0.05 askorbik asit oranında, 73°C’de (2.03 ± 0.18) en yüksek N-nitrozamin seviyesi bulunmuş, diğer sıcaklıklarda NDBA oluşumu daha düşük seviyelerde kalmıştır. % 0.1 ve % 0.15 askorbik asit oranlarında, sıcaklık arttıkça anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Bu durum, askorbik asit oranının ilk aşamada sıcaklık farkından bağımsız olarak benzer bir N-nitrozamin seviyesine yol açtığını göstermektedir.

Raf ömrü 30. gün ölçümlerinde, % 0.05 askorbik asit oranında 57°C ve 73°C arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 65°C’de (1.58 ± 0.38) biraz daha düşük değerler tespit edilmiştir. % 0.1 ve % 0.05 askorbik asit oranlarında, 57°C ve 65°C sıcaklıklarında düşük seviyeler görülmüşken 73°C’de (1.57 ± 0.51) anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

Raf ömrü 60. gün ölçümlerinde, % 0.05 askorbik asit oranında 65°C’de (2.45 ± 0.37) en yüksek değer elde edilirken, 57°C ve 73°C’de (1.64 ± 0.34 ve 2.16 ± 0.41) değerler daha düşük bulunmuştur. % 0.1 askorbik asit oranında, 65°C’de (2.58 ± 0.25) en yüksek değer, 57°C’de (1.22 ± 0.44) en düşük değer tespit edilmiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, gruplar arasında önemli farklılıklar bulunmuş, 57°C ve 65°C’de düşük seviyeler görülürken 73°C’de (1.55 ± 0.58) belirgin bir artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı askorbik asit oranları ve ısıl işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince NDBA oluşumu üzerine etkileri.

Raf ömrü 90. gün ölçümlerinde, % 0.05 askorbik asit oranına sahip 1. formülasyon ve 73°C ısıtım işlem uygulanmış olan örneklerde (4.57 ± 1.16) en yüksek değer bulunmuş ve tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. % 0.1 askorbik asit oranında, sıcaklık arttıkça N-nitrozamin seviyesi artmış ve 65°C ve 73°C’de (3.15 ± 0.27 , ve 2.52 ± 0.5), en yüksek değerlere ulaşmıştır. % 0.15 askorbik asit oranında, en düşük seviyeler 65°C’de (1.68 ± 0.85) ve 73°C’de (2.00 ± 0.51) bulunmuştur, ancak 57°C grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Domanska ve ark., (2004), 72 saat buzdolabında muhafaza edilen 8 farklı işlenmiş et ürününde NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR ve NMOR analizleri yürütmüş ve 2.6-2.8 µg/kg seviyelerinde NDMA tespit etmişlerdir.

Özbay (2022) tarafından yürütülen çalışmada ise yedi gün depolanan sosislerde hem vakum hem MAP ambalaj altında NDMA ve MAP ambalajda NDBA tespit edilemezken, araştırılan diğer tüm uçucu N-nitrozamintürevleri oluşmuştur. Depolamanın son gününde yüksek askorbik asit uygulanmış örneklerde 2.79 µg/kg, düşük askorbik asit uygulanmış örneklerde ise 2.57 µg/kg seviyesinde NDBA oluştuğu belirlenmiştir. Vakum ambalajda ise ilk haftadan NDBA oluşmaya başlarken muhafaza süresince miktarı yakın seviyelerde seyreterek muhafazanın son gününde düşük askorbik asitli örneklerde 3.54 µg/kg, yüksek askorbik asit uygulamasında ise 3.36 µg/kg seviyesinde ölçülmüştür.

4.8. Nitrozodipropilamin Miktarı

Farklı oranlarda askorbik asit kullanılarak ve ısıtım işlem uygulanarak üretilen fermente sucukların NDPA değerleri Çizelge 4.8’ de verilmiştir. Sucuklarda olgunlaştırma işleminden raf ömrü sonuna kadar belirlenen NDPA değerleri 0-3.15 µg/kg aralığındadır. En yüksek NDPA değeri 1.formülasyon ile üretilen ve 73°C ısıtım işlem uygulanmış sucuklarda saptanmıştır. Bu örneklerde 90. günün sonunda NDPA oranı 3.15 µg/kg değerine kadar yükselmiştir, % 0.15 askorbik asitli 3. formülasyonda ise uygulanan ısıtım işlem NDPA üzerinde etkili olmuş ve raf ömrü sonunda 1 µg/kg’dan düşük olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerde askorbik asit, NDPA üzerinde azaltıcı etki göstermiş buna karşın raf ömrü boyunca depolama aşamaları NDPA miktarını artırmıştır.

Üretim ve depolama süreci ile NDPA seviyeleri arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, NDPA seviyelerinin zaman içinde belirgin değişiklikler gösterdiğini ve özellikle depolama sürecinde artış eğiliminde olduğunu göstermektedir. Başlangıçta (fermantasyon ve ısıtma işlem aşamalarında) NDPA seviyeleri genellikle sıfır veya çok düşük iken, depolama sürecinde (raf ömrü 30., raf ömrü 60. ve raf ömrü 90. günlerde) belirgin bir yükseliş gözlenmiştir.

Üretim aşamaları ve depolama ile ısıtma işlem derecesi arasındaki ikili etkileşim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç, ısıtma işlemin tek başına NDPA seviyeleri üzerinde doğrudan belirleyici bir faktör olmadığını göstermektedir.

Üretim aşamaları ve depolama ile askorbik asit oranı arasındaki ikili etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, askorbik asit oranının NDPA oluşumu üzerindeki etkisinin önemli olduğunu ve zaman ilerledikçe bu etkinin sürdüğünü göstermektedir. Daha yüksek askorbik asit oranlarında (% 0.15), NDPA seviyelerinin daha düşük olduğu, ancak özellikle % 0.05 askorbik asit uygulanmış örneklerde NDPA seviyelerinin artışı dikkat çekicidir. Bu durum, askorbik asidin NDPA oluşumunu engelleyici bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir.

Üretim ve depolama aşamaları, askorbik asit oranı ve ısıtma işlem derecesinin üçlü etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç, NDPA oluşumunun yalnızca zaman veya sıcaklık gibi tekil faktörlere bağlı olmadığını, aksine bu üç faktörün birlikte etkileşim halinde olduğunu göstermektedir. Özellikle düşük askorbik asit oranlarında NDPA seviyelerinin zamanla arttığı belirlenmiştir. Ancak, yüksek askorbik asit oranlarında NDPA seviyeleri baskılanmış ve 90. gün itibarıyla bile düşük kalmıştır.

Çizelge 4.8. Farklı askorbik asit oranları ve ısıt işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NDPA miktarı (µg/kg)

Askorbik asit oranı (%)	Isıl işlem derecesi (°C)	Fermantasyon	Isıl işlem	Olgunlaştırma	Raf Ömrü 30. gün	Raf Ömrü 60. gün	Raf ömrü 90. gün	p ¹
		Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	Ort.±S.S.	
% 0.05	57°C		1.07 ± 0.21Cc	1.08 ± 0.16Bb	1.33 ± 0.42Bc	2.08 ± 0.18Cd	3.09 ± 0.7De	0.024*
	65°C	0 ± 0Aa	0.82 ± 0.26Bb	0.89 ± 0.19Bb	0.99 ± 0.27Bb	1.34 ± 0.23Cc	2.15 ± 0.17Dd	0.012*
	73°C		0.79 ± 0.26Bb	0.98 ± 0.09Bb	1.07 ± 0.19Bb	1.41 ± 0.29Cc	3.15 ± 0.27De	0.002**
% 0.1	57°C		0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.73 ± 0.35Bb	0.83 ± 0.53Bb	1.06 ± 0.13Bc	0.001**
	65°C	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.8 ± 0.16Bb	0.86 ± 0.11Bb	1.62 ± 0.48Cc	0.018*
	73°C		0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.95 ± 0.26Bb	1.39 ± 0.25Cc	1.39 ± 0.25Cc	0.023*
% 0.15	57°C		0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.55 ± 0.12Bb	0.91 ± 0.12Bb	0.58 ± 0.11Bb	0.009**
	65°C	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0.27 ± 0.08Ba	0.96 ± 0.11C	0.001**
	73°C		0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	0 ± 0Aa	1.000
p ²		1.00	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

Etkileşim Ölçüm **p=0.000****; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı **p=0.000****; Ölçüm×Isıl İşlem Derecesi **p=0.120**; ÖA×AAO×İİD **p=0.000****

*p<0.05; **p<0.01. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

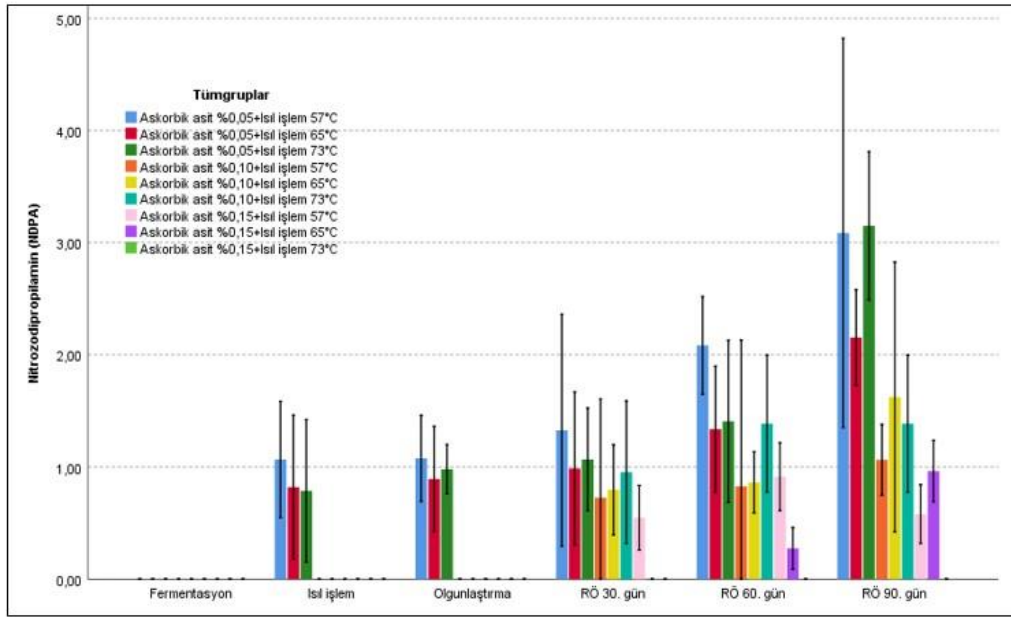
Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

Fermantasyon sürecinde, tüm gruplarda (% 0.05, %0.1% 0.15 askorbik asit oranlarında) fermantasyon aşamasında NDPA oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuç, fermantasyon sürecinde NDPA oluşumunun başlamadığını ve askorbik asidin bu aşamada oluşumu baskılandığını göstermektedir.

Olgunlaşmada, % 0.05 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C ısıtma işlem uygulamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamış, NDPA seviyeleri sırasıyla (1.08 ± 0.16). (0.89 ± 0.19) ve (0.98 ± 0.09) olarak belirlenmiştir. 1. ve 2. formülasyon örneklerin tüm ısıtma işlem uygulamaları için NDPA oluşumu gözlenmemiştir, bu da askorbik asit oranının yüksek olduğu gruplarda NDPA oluşumunun engellendiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince NDPA oluşumu üzerine etkileri

Raf ömrünün 30. gün ölçümlerine bakıldığında, %0.05 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.33 ± 0.42). 65°C’de (0.99 ± 0.27) ve 73°C’de (1.07 ± 0.19) seviyeleri gözlenmiştir. % 0.1 askorbik asit oranında, NDPA seviyeleri 57°C’de (0.73 ± 0.35), 65°C’de (0.8 ± 0.16) ve 73°C’de (0.95 ± 0.26) olarak tespit edilmiş ve sıcaklık arttıkça hafif bir artış gözlenmiştir.

% 0.15 askorbik asit oranında, NDPA seviyeleri 57°C’de (0.55 ± 0.12), 65°C’de 0 ve 73°C’de 0 seviyelerinde kalmıştır, bu da ısıtıl işlemin NDPA oluşumunda önemli bir etki oluşturmadığını göstermektedir.

Raf ömrü 60. gün ölçümlerinde ise % 0.05 askorbik asit oranında, NDPA seviyeleri 57°C’de (2.08 ± 0.18), 65°C’de (1.34 ± 0.23) ve 73°C’de (1.41 ± 0.29) seviyelerinde bulunmuş olup, özellikle 57°C’de belirgin bir artış gözlenmiştir. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.83 ± 0.53), 65°C’de (0.86 ± 0.11) ve 73°C’de (1.39 ± 0.25) seviyelerinde artış gözlenmiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C’de (0.91 ± 0.12), 65°C’de (0.27 ± 0.08) ve 73°C’de 0 değerleri saptanmıştır.

Raf ömrü 90. gün ölçümleri sonuçları incelendiğinde, %0.05 askorbik asit oranında, 57°C’de (3.09 ± 0.7), 65°C’de (2.15 ± 0.17) ve 73°C’de (3.15 ± 0.27) seviyelerinde bulunmuştur. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (1.06 ± 0.13) 65°C’de (1.62 ± 0.48) ve 73°C’de (1.39 ± 0.25) seviyelerinde olup, özellikle 65°C’de belirgin bir artış gözlenmiştir.

Özbay (2022) tarafından yürütülen bir çalışmada ısıtıl işlemin NDPA üzerine etkisinin önemli düzeyde olmadığı buna karşın NDPA’nın askorbik asit oranından ve depolama sürecinden önemli ölçüde etkilendiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise ısıtıl işlemin NDPA üzerinde tutarlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Yüksek askorbik asit uygulamasında ise ısıtıl işlem aşamasında NDPA oluşmamış olup sonraki aşamalarda yükselişler olmasına karşın düşük askorbik asitli örneklerde yükseliş daha belirgin olmuştur.

Hu ve ark. (2023) tarafından yürütülen bir çalışmada çeşitli Laktik asit bakterileri ve *Staphylococcus xylosus* ile olgunlaştırılan fermente sosislerde NDPA ve NDPA fermentasyon aşamasında oluşurken daha sonra olgunlaşma ve depolama sürecinde sabit kalmıştır. Aynı çalışmada NDEA’ nın hiç oluşmayıp NDMA’ nın oldukça düşük seviyelerde kalması fermente et ürünlerde dikkatleri starter kültür kullanımının olumlu etkilerine dikkat çekmektedir.

4.9. Nitrozodimetiletilamin Miktarı

Analiz edilen sucuk numunelerinin NMEA değerleri 0.82-30.83 µg/kg arasında değişim göstermiştir. 1. formülasyon ile üretilen sucuk numunelerinde NMEA oranları 30 µg/kg değerine kadar yükselmiştir. En yüksek askorbik asit oranına sahip 3. formülasyonlu örneklerde ise olgunlaşma aşamasında 12-14 µg/kg aralığında olan NMEA içeriği, raf ömrü bitiminde 16 µg/kg seviyesine kadar yükselmiştir (Çizelge 4.9).

Üretim ve depolama süreçleri ile NMEA seviyeleri arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), bu da NMEA seviyelerinin zaman içinde belirgin şekilde değiştiğini ve özellikle depolama sürecinde arttığını göstermektedir.

Üretim ve depolama süreci ile askorbik asit oranı arasındaki etkileşim de anlamlıdır ($p<0.05$). Daha yüksek askorbik asit oranlarında (% 0.15), NMEA oluşumu başlangıçta daha düşük seviyelerde kalmış, ancak zamanla belirli bir artış göstermiştir. Buna karşılık, daha düşük askorbik asit oranlarında (%0.05 ve %0.1), NMEA seviyeleri depolama süreci boyunca daha hızlı artış göstermiştir.

Üretim ve depolama süreci ile ısı işlem sıcaklığı arasındaki etkileşim ise anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu, ısı işlemin tek başına NMEA oluşumu üzerinde belirleyici bir faktör olmadığını, ancak depolama süreci ve askorbik asit oranı ile birlikte etkili olabileceğini göstermektedir.

Askorbik asit oranları, ısı işlem ve depolama sürecinin üçlü etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$), bu da askorbik asit oranı, ısı işlem sıcaklığı ve ölçüm süresinin birlikte NMEA oluşumu üzerindeki etkisinin belirgin bir doğrusal modele sahip olmadığını göstermektedir.

Fermantasyon sürecinde, % 0.05 askorbik asit oranında, (1.31 ± 0.35) en yüksek değerle başlarken, % 0.1 askorbik asit oranında, 1.00 ± 0.29 ve % 0.15 askorbik asit uygulaması ile 0.82 ± 0.21 değerine kadar düşüş olmuştur, ancak 2. ve 3. formülasyonlarda fermantasyon aşamasında oluşan fark önemsiz olmuştur.

Çizelge 4.9. Farklı askorbik asit oranları ve ısıt işlem dereceleri uygulanarak üretilen sucuklarda NMEA miktarı (µg/kg).

Askorbik asit oranı (%)	Isıl işlem derecesi (°C)	Fermantasyon <i>Ort.±S.S.</i>	Isıl işlem <i>Ort.±S.S.</i>	Olgunlaştırma <i>Ort.±S.S.</i>	Raf Ömrü 30. gün <i>Ort.±S.S.</i>	Raf Ömrü 60. gün <i>Ort.±S.S.</i>	Raf Ömrü 90. gün <i>Ort.±S.S.</i>	p ¹
% 0.05	57°C		5.26 ± 1.02Ba	21.33 ± 3.06Cb	25.4 ± 3.99Dc	26.7 ± 2.55Dc	27.87 ± 2.39Dc	0.001**
	65°C	1.31 ± 0.35Ab	9.36 ± 1.22Bb	23.8 ± 3.31Cb	26.03 ± 2.6Dc	27.17 ± 3.5Dc	27.83 ± 3.28Dc	0.000**
	73°C		12.2 ± 0.96Bc	28.47 ± 3.66Cc	30.8 ± 2.31Cd	30.17 ± 4.78Cd	30.83 ± 7.12Cc	0.011*
%0.1	57°C		7.84 ± 1.37Bb	14.53 ± 2.18Ca	13.77 ± 4.46Ca	22.1 ± 4.53Db	23.77 ± 4.01Db	0.015*
	65°C	1.00 ± 0.29Aa	10.43 ± 1.36B	16.13 ± 3.29Ca	18.47 ± 1.64Cb	27.3 ± 1.59Dc	26.67 ± 1.5Dc	0.007**
	73°C		7.58 ± 0.79Bb	16.47 ± 1.76Ca	19.8 ± 1.66Cb	27.43 ± 1.92Dc	29.1 ± 1.25Dc	0.000**
% 0.15	57°C		8.24 ± 0.55Bb	14.33 ± 1.66Ca	12.1 ± 1.21Ca	12.43 ± 1Ca	16.43 ± 1.1Ca	0.002**
	65°C	0.82 ± 0.21Aa	7.84 ± 1.37Bb	13.17 ± 1.4Ca	14.1 ± 2.21Ca	15.67 ± 1.9Ca	16.57 ± 0.71Ca	0.008**
	73°C		8.50 ± 1.05Bb	12.1 ± 1.21Ca	11.1 ± 1.08Ca	12.53 ± 1.59Ca	13.9 ± 0.75Ca	0.001**
p ²		0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

Etkileşim Ölçüm **p=0.000****; Ölçüm×Askorbik Asit Oranı **p=0.000****; Ölçüm×Isıl İşlem Derecesi p=0.228; ÖA×AAO×İİD p=0.088

*p<0.05; **p<0.01. Harflendirme: Post Hoc Testleri, Soldan sağa olan harflendirme büyük harfler ile gösterilmiştir, Yukardan aşağıya olan harflendirme küçük harflendirme ile gösterilmiştir.

Etkileşim: Karışık Ölçümlerde 3x3 Faktörlü Varyans Analizi.

p1: 9 farklı her bir gruptaki ölçümler arasındaki farklılık (Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA).

p2: 9 farklı gruba göre her bir ölçümün karşılaştırılması (One Way ANOVA).

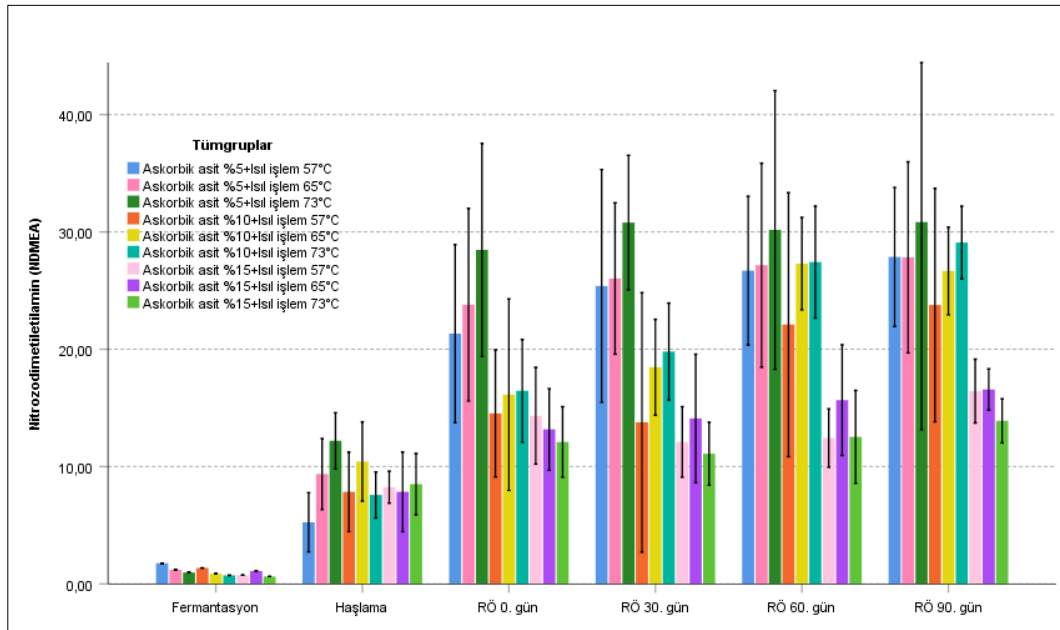
Isıl işlem sürecindeki ölçümler incelendiğinde, % 0.05 askorbik asit oranında, ısıtma işlem sonrası 57°C’de (5.26 ± 1.02) seviyesinde kalırken, 65°C’de (9.36 ± 1.22) ve 73°C’de (12.2 ± 0.96) anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu durum, ısıtma işlem sürecinde sıcaklık arttıkça NMEA oluşumunun önemli derecede yükseldiğini göstermektedir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C ısıtma işlemlerinde sırasıyla 8.24 ± 0.55 , 7.84 ± 1.37 ve 8.5 ± 1.05 seviyelerinde olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum, askorbik asit oranının yüksek olması halinde ısıtma işlem sürecindeki NMEA oluşumunun daha sınırlı kalabileceğini göstermektedir.

Olgunlaşma aşamasında, % 0.05 askorbik asit oranında, 57°C ve 65°C arasında anlamlı bir fark bulunmazken (21.33 ± 3.06 ve 23.8 ± 3.31), 73°C’de (28.47 ± 3.66) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu sonuç, yüksek sıcaklığın NMEA oluşumunu artırdığını göstermektedir. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C arasında anlamlı bir fark bulunmamış (14.53 ± 2.18 , 16.13 ± 3.29 ve 16.47 ± 1.76), ancak değerler % 0.05 grubuna kıyasla daha düşük kalmıştır. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiş (14.33 ± 1.66 , 13.17 ± 1.4 ve 12.1 ± 1.21) ve NMEA seviyeleri en düşük seviyelerde kalmıştır.

Raf ömrünün 30. gün analizlerinde, 1. formülasyon örnekler için 57°C ve 65°C arasında anlamlı bir fark bulunmazken (25.4 ± 3.99 ve 26.03 ± 2.6), 73°C’de (30.8 ± 2.31) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. % 0.1 askorbik asit uygulanmış 2. formülasyonda ise 57°C’de (13.77 ± 4.46) ile en düşük seviye bulunurken, 65°C ve 73°C’de (18.47 ± 1.64 ve 19.8 ± 1.66) anlamlı artış gözlenmiştir. %0.15 askorbik asit oranı uygulanmış örneklerde ise 57°C, 65°C ve 73°C ısıtma işlem uygulamaları arasında fark bulunmamış (12.1 ± 1.21 , 14.1 ± 2.21 ve 11.1 ± 1.08). NMEA seviyeleri düşük kalmıştır.

Depolamanın 60. gün ölçümlerinde, 1. formülasyon örneklerinde 57°C, 65°C ve 73°C arasında fark bulunmamış, (26.7 ± 2.55 , 27.17 ± 3.5 ve 30.17 ± 4.78) seviyelerinde kalmıştır. % 0.1 askorbik asit oranında, 57°C’de (22.1 ± 4.53) ile en düşük seviye bulunurken, 65°C ve 73°C’de (27.3 ± 1.59 ve 27.43 ± 1.92) anlamlı artış gözlenmiştir. % 0.15 askorbik asit oranında, 57°C, 65°C ve 73°C uygulamaları arasında fark bulunmamıştır (12.43 ± 1.0 , 15.67 ± 1.9 ve 12.53 ± 1.59).

Raf ömrünün 90. gün ölçümlerinde, %0.05 askorbik asit oranına sahip örneklerde 57°C, 65°C ve 73°C ısıtma işlemi uygulanmış gruplar arasında fark önemli bir fark oluşmamıştır (27.87 ± 2.39 , 27.83 ± 3.28 ve 30.83 ± 7.12). %0.1 askorbik asit uygulanmış 2. formülasyon örneklerde 57°C’de (23.77 ± 4.01) ile en düşük seviye bulunurken 65°C ve 73°C’de (26.67 ± 1.5 ve 29.1 ± 1.25) anlamlı artış gözlenmiştir. 3. formülasyon sucuk örneklerinde ise 57°C, 65°C ve 73°C ısıtma işlemi uygulamaları arasında fark oluşmamıştır (16.43 ± 1.1 , 16.57 ± 0.71 ve 13.9 ± 0.75).



Şekil 4.7. Farklı askorbik asit oranları ve ısıtma işlem derecelerinin üretim ve depolama süresince NMEA oluşumu üzerine etkileri

Wang ve ark., (2023) tarafından Güney Kore piyasasından toplanan sosis örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada örneklerin hiçbirisinde NMEA’ye rastlanmamıştır, buna karşın yapılan analizlerde N-nitrozamin bileşiklerinden en çok NDEA ve NDMA saptanmıştır.

Özbay (2020) tarafından yürütülen benzer çalışmanın bulgularına göre, üretim sürecinin ilk 4 aşamasında uçucu N-nitrozamin türevleri saptanmazken, depolamanın 90. gününde en yüksek seviyede NMEA ($2.53 \mu\text{g/kg}$) olduğu tespit edilirken yüksek askorbik asit ilaveli sosis örneklerinde bu aşamada $0.47 \mu\text{g/kg}$ seviyesinde NMEA olduğu görülmüştür. Üretim ve depolama aşamalarının tamamında, askorbik asit oranının NMEA üzerinde anlamlı düzeyde baskılayıcı etki yaptığı da aynı çalışmanın sonunda rapor edilmiştir.

Çalışmamızda NMEA oranları diğer N-nitrozamin türevlerine göre tüm aşamalarda daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Konu ile ilgili literatür taraması yapıldığında, et ürünlerinde NMEA ile ilgili çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir.

4.10. Pişirme işlemi uygulanan sucuklarda N-nitrozamin miktarı

Farklı yöntemlerle pişirilen sucuklardaki N-nitrozamin konsantrasyonları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Başta NDMA ve NDEA olmak üzere araştırılan N-nitrozamin türlerinin tamamı analiz edilen örneklerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı yöntemlerle pişirilen sucuklardaki N-nitrozamin miktarları (µg/kg).

Piştirme Yöntemi	NDEA	NDMA	NDBA	NPIP	NPYR	NDPA	NMEA
Kontrol	0.50±0.05a	2.82±0.63a	1.46±0.42a	8.73±5.93a	0.33±0.07a	0.52±0.04a	27.46±7.42a
Izgara	3.30±0,21b	24.80±2.2b	4.23±0.76b	26.38±4.88b	0.92±0.07b	4±0.92b	60.00±17.57b
Mikro Dalga	0.73±0.07a	5.19±0.57c	2.26±0.61c	16.32±4.53c	T.E	T.E	34.90±9.22c
Yağda Kızartma	4.54±0.75c	64.50±7.83d	9.14±3.80d	26.49±6.92b	0.85±0.07c	1.50±0.9c	70.80±6.70b

T.E: Tespit edilemedi

Kızartma yönteminde mikrodalga yöntemine göre daha yüksek uçucu N-nitrozamin düzeyleri tespit edildi. Kızartma işlemi ile NMEA 70 µg/kg seviyesine ulaşırken, NMEA'yı takiben NDMA 64 µg/kg, NPIP 26,5 µg/kg, NDBA 9,14 µg/kg, NDEA 4.5 µg/kg, NDPA 1.5 µg/kg, NPYR 0.85 µg/kg olarak saptanmıştır.

Bir diğerk pişirme şekli olan ızgarada ise yüksek seviyede NMEA meydana geldiği tespit edildi. Kızartma işlemi ile NMEA 60 µg/kg seviyesine ulaşırken, NMEA'yı takiben NDMA 24.8 µg/kg, NDEA 3.3 µg/kg, NPIP 26,4 µg/kg, NPYR 0.92 µg/kg, NDBA 4.23 µg/kg ve NDPA 4 µg/kg olarak saptanmıştır.

Pişirme işlemlerinden bir diğeri olan mikrodalga pişirmede ise uçucu N-nitrozamin türevlerinin diğerk pişirme yöntemleri ile kıyaslandığında daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Mikrodalga pişirme işlemi ile NMEA 34 µg/kg seviyesine ulaşırken, NMEA'yı takiben NPIP 16,3 µg/kg, NDMA 5,2 µg/kg, NDBA 2.26 seviyesinde tespit edilmiştir. NPYR ve NDPA ise tespit edilebilir limitin altında kalmıştır.

4.11. Tartışma

Çalışmada elde edilen bulgular incelendiğinde, üretim sürecinde ve son üründe uçucu N-nitrozamin bileşiklerinin oluşabildiği görülmektedir. Bu durum büyük oranda, sucuk formülasyonu içerisine başlangıçta ilave edilen nitritli tuzun, üretim sürecindeki ısı işlemler sebebiyle protein değeri yüksek et içerisindeki amin yapıları ile reaksiyona girmesi ve uçucu N-nitrozaminbileşiklerini oluşturmamasından kaynaklanmaktadır (Filho ve ark., 2003). Çalışmada proses sürecine ait bulguları daha önce yapılan çalışmalara ait bulgular desteklemektedir. Campillo ve ark., (2011), sosis, jambon, kürlenmiş et, konserve et gibi farklı 21 adet işlenmiş et ürünü üzerine yaptıkları çalışmalarında sadece kürlenmiş ürünlerin değil, köfteler ya da ısı işlemleri görmemiş çiğ ürünlerin de N-nitrozamin içerebildiğini bildirmişlerdir.

Ülkemizde et ürünlerinde bulunabilecek N-nitrozamin miktarı ile ilgili mevzuat maddesi bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde kürlenmiş et ürünleri için 10 µg/kg toplam uçucu N-nitrozamin sınırı belirlenmiştir (Crews, 2010). Bu çalışmada kontrol numunesi olarak analiz edilen olgunlaşmış çiğ sucuklarda N-nitrozamin içerikleri, NMEA hariç 10 µg/kg'ın altında tespit edilmiştir.

IARC tarafından muhtemel kanserojen olarak sınıflandırılan NDEA ve NDME oranlarına bakıldığında en yüksek artışın yağda kızartma işleminde olduğu, mikrodalga yönteminde ise 10 µg/kg'ın altında kaldığı görülmektedir. Bununla beraber, NDMA'nın ızgara ve yağda kızartma işlemlerinde bu denli yükselmesi dikkat çekicidir. Analiz ettiğimiz örneklerde NDMEA miktarı oldukça yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde ortalama 27 µg/kg iken ızgara

işlemi ile 70 µg/kg seviyesine kadar yükselmiştir. Ancak bu N-nitrozamin türü IARC tarafından muhtemel kanserojen olarak sınıflandırılmamaktadır.

Askorbik asitin N-nitrozamin oluşumuna etkilerinin incelendiği birçok çalışmada araştırmacılar, askorbik asitin uçucu N-nitrozamin seviyesinin düşmesini teşvik ettiği ve özellikle NDMA oluşumunu oldukça engellediğini bildirmişlerdir (Pirinçi ve ark., 1986; Li ve ark., 2012; Marriott ve ark., 1981; Mejbörn ve ark., 2019 ve Rywotycki, 2002). Bu durum, askorbik asitin, nitritin, nitrik okside indirgenmesini sağlayarak nitrit miktarının kademeli olarak düşmesinden kaynaklanmaktadır (Li ve ark., 2013). Rywotycki (2001) yaptığı çalışmada, NaCl ve sodyum askorbatın, 21 domuz eti örneğinde NDMA ve NDEA miktarını önemli oranda düşürdüğünü bildirmiştir. Yürüttüğümüz bu tez çalışması, tüm süreçlerde askorbik asitin N-nitrozamin oluşumunu azalttığını ortaya koyarak geçmiş çalışmaları desteklemektedir.

Li ve ark., (2012) tarafından kurutulmuş ve kürlenmiş sosislerde yapılan bir çalışmada, yağda kızartma işleminin mikrodalga pişirme yöntemine göre NDMA, NDEA ve NPYR miktarlarında % 20 artışa yol açtığı görülmekte olup sonuçlar çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Kurutulmuş ve tütülenmiş sosislerde yapılan başka bir çalışmada en yüksek N-nitrozamin oranı ızgara ile pişirilmiş örneklerde bulunmuş olup 2. sırada yağda kızartma işlemi gören örnekler yer almıştır. Mikrodalga pişirme ise N-nitrozamin oluşumu üzerine önemli bir etki göstermemiştir (Mirzazadeh ve ark., 2021).

Bu sonuçlar, NDMA ve NDEA'nın kurutulmuş ve kürlenmiş sosislerde yaygın olarak bulunduğunu gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir (Rywotycki, 2002; Yurchenko ve Molder, 2007)

Pişirme işlemleri sonucunda proteinlerin pirolize olmasıyla meydana gelen ikincil aminler, et ürünlerinde bulunabilen nitrozlama ajanları ile etkileşime girerek N-nitrozaminlerin oluşumuna yol açabilmektedirler (Li ve ark., 2012).

Bulgulara genel olarak bakıldığında, üretimden tüketimin son gününe kadar sucuk içerisinde muhtemel kanserojen N-nitrozamin bileşiklerinin meydana geldiği söylenebilir. Askorbik asit seviyesi yükseldikçe her aşamada N-nitrozamin oluşumu önemli ölçüde azalmaktadır ($p<0.05$). Muhafaza sürecinde sucuk örneklerinde N-nitrozamin miktarının artması, diğer bazı çalışmaların sonuçları ile benzerdir (Xiao ve ark.,2018; Domanska ve Kowalski, 2002; Domanska ve ark., 2004).

N-nitrozamin bileşiklerinin seviyeleri, pişirme işlemlerinin tamamında, çiğ haldeki durumlarına oranla anlamlı ($p<0.05$) bir farkla değişmektedir. Yani kanserojen N-nitrozamin bileşiklerinin ısı ile işlemle oluştuğunu söylemek mümkündür. Çalışmanın bu verisi de daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Yürchenko ve Mölder, 2007; Yuan ve ark., 2015; Özbay, 2022)

Bunun yanında tüm bu bulgular, kürlenmiş et ürünlerinde pişirmeden sonra N-nitrozaminlerde önemli bir değişiklik gözlemlemeyen Sen ve ark., (1979) bulgularıyla çelişmektedir. Hatta Nitrit Güvenlik Konseyinin (1980), fırınlama, kızartma veya mikrodalga ısıtma gibi pişirme yöntemlerinin soslerde N-nitrozamin oluşumunda önemli bir etkiye neden olmadığına dair bir beyanatı mevcuttur.

Bu farklı bulgular, farklı pişirme süreleri ve sıcaklıkları ile mevcut amin ve nitrozaştırıcı maddelerin farklı içerikleri ve türlerinden kaynaklanıyor olabilir. Farklılıkların bir diğer olası nedeni de uçucu N-nitrozaminlerin pişirme ve fırınlama sırasında uçması veya ayrışmasıdır (Tricker ve ve Preussmann, 1991). Bharucha ve ark., (1979), pastırmanın kızartılması sırasında üretilen NDMA'nın % 62'sine ve NPYR'nin %32' sine kadarının uçucu fraksiyonlarda olduğunu bildirmiştir.

5. SONUÇLAR

Araştırmamızda sucuk örneklerinin tamamında NDBA, NDPA, NDMA, NPYR, NPIP, NMEA ve NDEA olmak üzere 7 N-nitrozamin türü aranmış ve tamamı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında sırasıyla üretim, muhafaza ve tüketim öncesi pişirme aşamalarındaki N-nitrozamin bileşikleri ve seviyeleri araştırılmıştır. Bulgular bölümünde üretim süreçlerinde oluşan N-nitrozamin bileşiklerinin ortalama düzeyleri ve askorbik asitin etkisi detaylı olarak verilmiştir.

Özellikle, Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından muhtemel kanserojen olarak sınıflandırılan NDMA ve NDEA üzerinde askorbik asit ilavesinin azaltıcı, ısıtma işlem uygulamasının ve raf ömrü boyunca bekleme aşamasının artırıcı etkisi olmuştur.

Doğal fermente sucuklarda istenilen yapı; fermentasyon sürecinde pH düşüşü, nem kaybı ve çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu gerçekleşmekte olup süreç haftalarca devam edebilmektedir. Endüstriyel ölçekli üretimlerde ise maliyetleri düşürmek ve sucukta yapı gelişimi amacıyla ısıtma işlem uygulaması yapılmaktadır. Çalışmamızda, ısıtma işleminin N-nitrozamin türevlerinin bir çoğu miktarı üzerinde artış yönünde etki yaptığı saptanmıştır.

Yaptığımız çalışma ile N-nitrozamin oluşumunun çevresel şartlardan oldukça etkilenebileceği de ortaya çıkmıştır. Muhafaza şekli, muhafaza süresi, üretim aşamalarında uygulanan ısıtma işlem sıcaklık değişimleri, pişirme yöntemi farklılıkları, N-nitrozamin miktarlarını belirgin oranda etkilemektedir. Bu ve buna benzer konularda yapılan farklı çalışmalar da, uçucu N-nitrozamin seviyelerinin değişkenliğini doğrulamaktadır.

Bu çalışma sucukların N-nitrozamin içeriğinin pişirme yöntemlerine göre de değiştiğini göstermiştir. Yağda kızartma ve ızgara işlemleri sonucunda, Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından kanserojen olduğu bildirilen N-nitrozaminlerden özellikle NDMA miktarlarındaki artış dikkat çekicidir. Kızartma ve ızgara işleminin N-nitrozaminlerin oluşumunu tetikleyen öncül maddelerin oluşumunu teşvik ettiği sonucuna varılabilir. Çalışma boyunca en yüksek miktarlar NMEA ölçümünde saptanmıştır. Mikrodalga işlemlerinin

N-nitrozamin oluşumu üzerinde etkisi oldukça sınırlı kalmıştır. Bu durumun, yüksek sıcaklığa kısa sürelerde maruz kalmaktan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın bir diğer sonucu ise, muhafaza süreci boyunca örneklerde, N-nitrozamin oluşumunun artarak devam etmesidir. Bu açıdan ürünlerin son tüketim tarihine dikkat edilmesi ve taze iken tüketilmesi de N-nitrozamin alım riskini azaltabilecektir. Nitrat ve nitritin işlenmiş et ürünlerinde renk oluşumu, hem antioksidan ve antimikrobiyal etki anlamında olumlu sonuçlar verdiği ve önemli bir katkı maddesi olduğu bilinmektedir.

Ancak kullanımın yasal sınırlar içinde kalması, üretim tekniklerinin iyileştirilmesi ve alternatif doğal koruyucu maddelerin geliştirilmesi ile kanserojen N-nitrozamin oluşum miktarı büyük ölçüde düşürülebilecektir.

Sonuç olarak nitrit ve nitrat tuzları ile kürlenerek hazırlanmış sucuklarda pişirme işlemi sonrasında N-nitrozamin oluşum riskinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun önüne geçmek veya N-nitrozamin oluşumunu belli limitlerin altına indirmek için yapılmış olan bazı çalışmalarda askorbik asit, bitki fenoller, yeşil çay polifenoller, üzüm çekirdeği ekstresi, α -tokoferol, yaban mersini, kızılıçık, fermente soya sosu ve dut polifenoller kullanımının olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Günümüzde, üretim koşulları iyileştirilmiş, katkı maddeleri kullanım oranları daha sıkı denetim altına alınmış ve böylece N-nitrozamin seviyeleri olabildiğince düşürülmüştür. Önceki yıllarda sodyum nitrit piyasada saf halde bulunabilirken artık sodyum klorür tuzunun içine uygun oranda ilave edilmiş olarak satışı yapılmaktadır. Böylece, uygun dozdan daha yüksek oranda kullanım riski azaltılmıştır.

Sonuç olarak sucuk; üretiminden, tüketiminin son gününe kadar N-nitrozamin oluşumu açısından risk taşımaktadır. Üretim esnasında askorbik asit miktarının artırılmasının toplam N-nitrozamin oluşumunu her aşamada azalttığı belirlenmiştir. Tüketim süreçlerinde yapılan tercihler de N-nitrozamin alım miktarını büyük oranda değiştirmektedir.

Üreticilerin N-nitrozamin oluşumu konusunu, Ar-Ge süreçlerinde daha fazla ele alması ve geliştirilen yeni ve alternatif formülasyonlarla ürünleri piyasaya arz etmesi önemlidir. Ayrıca işletmede kullanılan su, et ve baharatın başlangıç nitrat-nitrit seviyesinin düşürülmesi ve buna bağlı olarak N-nitrozamin değerlerinin de azaltılması konusunda çalışmalar yapılmalıdır. Son olarak, muhtemel kanserojen N-nitrozaminlerin hızlı analizini sağlayacak tekniklerin geliştirilmesi de faydalı olacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Alper, N., ve Temiz, A., 2001. Gıdalardaki biyojen aminler ve önemi, biogen amines in food. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 58, (2), 71-80.
- Akan, S., ve Demirağ, M. K., 2018. Gıdalarda biyojen amin oluşum mekanizmalarına etki eden faktörler ve biyojen aminlerin diğer bileşiklere dönüşümleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 24, (7), 1388-1392.
- Astill, B. D. ve Mulligan, L. T., 1977. Phenolic antioxidants and the inhibition of hepatotoxicity From N-dimethylnitrosamine formed in situ in the rat stomach. *Food Cosmetics Toxicology*. 15, 167.
- Anonim, 2011. Environmental guidelines and regulations for nitrosamines: A Policy Summary Final Report [Revision 2]. 10 July 2011.
- Anonim, 2013. Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, No. 2013/28693. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Ankara.
- Anonim, 2015. Q&A on the carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat. <https://www.who.int/features/qa/cancerred-meat/en/>. Erişim tarihi: 08/07/2023.
- Anonim, 2023. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Resmi Gazete. Sayı: 32338.
- Bayraktar, N., Gökçe, R., Ergün, Ö., 1998. Gıdalarda nitrat ve nitrit kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri. *Çev-Kor*. 7, (28), 28-30.
- Bharucha, K.R., Cross, C. K., ve Rubin, L. J. 1979. Mechanism of N-Nitrosopyrrolidine formation in Bacon. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 27, (1), 63-69.
- Binstok, G., Campos, CA., ve Gerschenson, L N., 1996. Determination of nitrites in meat systems: An improved procedure, *Meat Science*. 42, (4), 401-405.
- Cassens, R.G., 1997. Residual Nitrite in Cured Meat. *Food Technology*, 51, (4), 53-55.
- Campillo, N., Vgnas, P., Martínez-castillo, N., Hernández-córdoba, M., 2011. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave assisted extraction and dispersiv liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218, (14), 1815-1821.
- Challis, B C., Bartlett, C.D., 1975. Possible carcinogenic effects of coffe constituents. *Nature*, 254. 532.
- Crews, 2010. Determination of nitrosamines in food. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. (2), (2), 2-12.
- Çolak, H., ve Aksu, H., 2002. Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı ve amin oluşumunu etkileyen faktörler, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 13, (1-2), 35-40.
- De Mey, E., De Maere, H., Goemaere, O., Steen, L., Peeters, M-C., Derdelinckx, G., Paelinck, H., Fraeye, I., 2014a. Evaluation of n-nitrosopiperidine formation from biogenic amines during the production of dry fermented sausages. *Food Bioprocess Technology*. 7, 1269-1280.
- De Mey, E., De Maere, H., Dewulf, L., Paelinck, H., Sajewicz, M., Fraeye, I., Kowolska, T., 2014b. Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine contained in spices used as meat product additives, *European Food Research Technology*, 238, 477-484.
- Deng, S., Shi, S., Xia, X., 2022. Effect of plant polyphenols on the physicochemical properties, Residual nitrites, and N-nitrosamine formation in dry-fried bacon. *Meat Science*. 191, (12), 58-62.

- Douglass, ML., Kabacoff, BL., Anderson, GA., Cheng, MC., 1978. The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *Journal Social Cosmetics Chemistry* 29, (9), 581- 606.
- Domanska, K., Michalski, M., Kowalski, B., 2004. Effect of different storage conditions on nitrates and nitrites in Polish edible offals processed meat products. Influence on N nitrosamine content. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 48, (1), 63-68.
- Domanska, K., Kowalski, B., 2002. Effect of different storage conditions on N-nitrosamine content in Polish edible offals processed meat products. *Bulletin Veterinary Institute In Pulawy*, 46, (2), 317-324.
- Drabik-Markiewicz, G., Maagdenberg, K.V., De Mey, E., Deprez, S., Kowalska, T., 2009. Role of proline and hydroxyproline in N-nitrosamine formation during heating in cured meat, *Meat Science*. 81, (3), 479-486.
- Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Impens, S., Kowalska, T., Paelinck, H., Vander Heyden, Y., 2010. Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. *Analytica Chimica Acta*. 657, (2), 123-130.
- Ender, F., Havre, G., Helgebostad, A., Koppang, N., Madsen, R., Ceh, L., 1964. Solation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften*. 51, (January), 637-638.
- Filho, S., Rgos A., Valcárce, M., Zangn, KD., Caramao, EB., 2003. Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction micellar electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography*. 985, (1), 503-512.
- Gençcelep, H., 2010. Sucuklarda kalıntı nitrit miktarı ve N-nitrozamin oluşumu ile ilişkisi. *Traditional Foods From Adriatic to Caucasus*, April 15-17, Tekirdağ, Turkey.
- Gray, J. I., Collins, M., E., 1977. A comparison of proline and putrescine as precursors of N- nitrosopyrrolidine in nitrite-treated pork system. *Journal of Food Science*. 42, (4), 1034-1037.
- Gloria, M., B., A., Barbour, J., F., Scanlan, R., A., 1997. Volatile Nitrosamines in Fried Bacon, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45, (5), 1816-1818.
- Gökalp, H.Y., 1983. Et ürünlerinde nitrat, nitrit kullanımı ve nitrit zehirlenmesi. *Gıda*, 8, (5), 239-243.
- Gray, J. I., Dugan, L. R., 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems, *Journal of Food Science*, 40, (5), 981-984.
- Gonzalez-Mancebo, S., Garcia-Santos, M.P., Hernandez-Benito, J., Calle, E., Casado, J., 1999. Nitrosation of Phenolic Compounds: Inhibition and Enhancement, *Journal Agricultural Food Chemistry*. 47, (6), 2235-2240.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö., 2002. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Yayın No:786, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum.
- Hammes, W.P., 2012. Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods, *Food Microbiology*. 29, (2), 151-156.
- Honikel, K., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78, (12), 68-76.
- Hu, P., Ali, U., Aziz, T., Wang, L., Zhao, J., Nabi, G., Sameeh, MY., Yu. Y., Zhu, Y., 2023. Investigating the Effect on biogenic amines, nitrite, and N-nitrosamine degradation in cultured sausage ripening through inoculation of *Staphylococcus xylosus* and lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiologie*. 4, 79-83.

- Herrmann, S.S., 2014. N-nitrosamines in processed meat products analysis, occurrence, formation, mitigation and exposure, PhD Thesis, Technical University of Denmark, National Food Institute, Division of Food Chemistry.
- Herrmann, S.S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K., 2015a. Occurrence of Volatile and Non-Volatile N-nitrosamines in processed meat products and role of heat treatment. *Food Control*, 48, 163-169.
- Herrmann, S.S., Granby, K., Duedahl-Olesen, L., 2015b. Formation and Mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*. 174, 516- 526.
- Hofmann, K., 1979. Die Nitrosamine ein Problem, das alle angeht. *Fleischwirtschaft*. 9, (6), 823-825.
- Hotchkiss, J.H., 1987. A review of current literature on N-nitroso compounds in foods. *Advances in food research*, 31, 53-115.
- IARC., 1987. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Vols. 1–42, Suppl. 7, monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Jira, W., 2004. Chemische Vorgänge beim Pökeln und Rauchern. *Mitteilungsblatt BAFF*. 43, (163), 27-38.
- Krause, B.L., Sebranek, J.G., Rust, R.E., Mendonca, A., 2011. Incubation of curing brines for The production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked And sliced ham. *Meat Science* 89, (4), 507-13.
- Karovicova, J., Kohajdova, Z., 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59, 70–79.
- Kaya, M., ve Kaban, G., 2016. Fermente et ürünleri. *Gıda Biyoteknolojisi*. Nobel Yayıncılık, İstanbul, 157-190.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2009. The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment On biogenic amine formation of “sucuk”. A Turkish dry fermented sausage, *Meat Science*. 82, (2), 179-184.
- Lee H.S., 2019. Literature compilation of volatile N-nitrosamines in processed meat and poultry products an update. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 36, (10), 1491-1500.
- Li, L., Shao, J., Zhu, X., Zhou, G., Xu, X., 2013. Effect of plant polyphenols and ascorbic acid on lipid oxidation, residual nitrite and N-nitrosamines formation in dry-cured sausage, *International Journal of Food Science and Technology*. 48, (6), 1157-1164.
- Li, L., Wang, P., Xu, X., Zhou, G., 2012. Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile n-nitrosamines and biogenic amines in dry cured sausages. *Journal Of Food Science*. 77, (5), 560-565.
- Lijinsky, W., 1999. N-nitroso compounds in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 443, (12), 129-138.
- Liu, X., Miller, M., Joshi, M., Thomas, D., & Lancaster, J., 1998. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 95,(5), 2175–2179.
- Lu, J., Li, M., Shen, M., Xie, J., & Xie, M. 2023. Advanced glycation end products and nitrosamines in sausages influenced by processing parameters. *Food Additives and Fat during Thermal Processing*. *Foods*, 12, (2), 394.
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M., 2008. The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, 226,(3), 449-458.

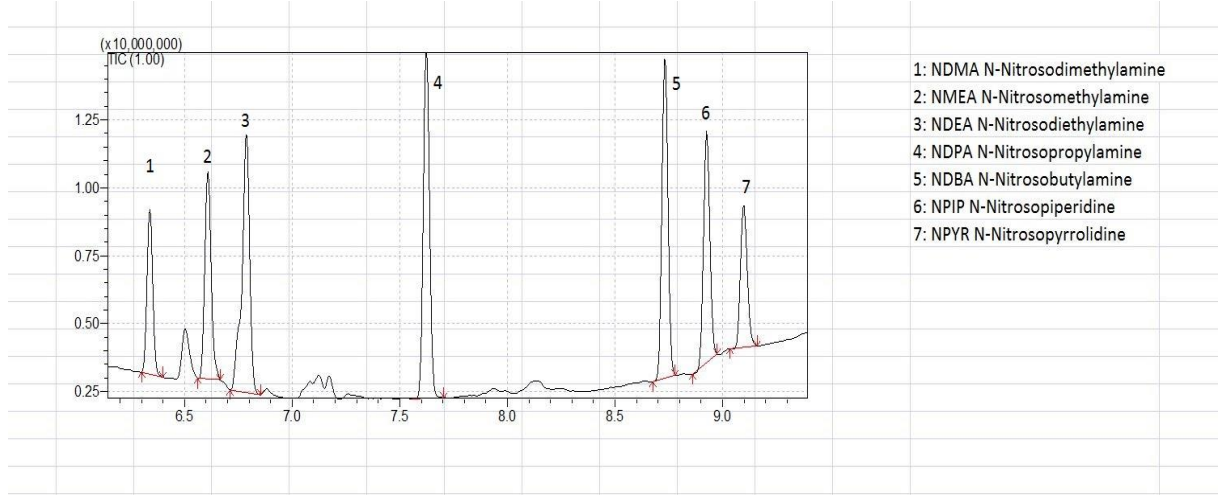
- Magee, P. N., ve Barnes, J.M., 1956. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*. 10, (1), 114–122 .
- Marco, A., Navarro J. L., Flores M., 2006. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow fermented sausage. *Meat Science*, 73, (4) 660-673.
- Marriott, N.G., Lechowgch, R.V., Pğerson, M.D. 1981. Use of nitrite and nitrite sparing agents in meats: A review. *Journal of Food Protection*, 44, (11), 881-885.
- Mejborn, H., Hansen, M., Bğltoft-Jensen, A., Chrğstensen, T., 2019. Suggestion for a subdivision of processed meat products on the Danish market based on their content of carcinogenic compounds. *Meat science*, 147, (Jan), 91-99.
- Mirzazadah, M., Sadeghi, E., Beigmohammadi, F., 2021, Comparison of the effects of microwave cooking by two conventional cooking methods on the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile N-nitrosamines in beef cocktail smokies, *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, (6), 67-71.
- Al-Kaseem, M., Al-Assaf, Z., Karabeet, F., 2014. Determination of seven volatile Nitrosamines in fast food, *Pharmacology & Pharmacy*, 5, (2), 195-203.
- Özdemir, M., Batı, B., Gökalg, HY., 1984. Nitrate, nitrite and N-nitrosamine contents of Turkish Soudjouks, *Fleischwirtschaft*, 64, (12), 1497-1499.
- Özçelik, S. 1982. Bazı gıdalarda nitrit ve nitrosaminlerin oluşumu ve sağlığa zararlı etkileri. *Gıda*, 7, (4), 183-188.
- Özbay, S., 2022. Determination of volatile N-nitrosamines formed in salami cooked by different processes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112, (Sep.) 23-27.
- Özbay, S., Şireli, U.T., 2022. The effect of ascorbic acid, storage period and packaging material on the formation of volatile N-nitrosamine in sausages. *Journal Food Science Technology* 59, (5), 1823–1830
- Özta, A., Vural, H., Helvacı, R., 1991. Sosis üretiminde nitrozomyoglobin ve kalıntı nitrit miktarlarını etkileyen faktörler. *Gıda* 16, (2), 117-121.
- Özel, M. Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J.F., Lewis, A.C., 2010. Determination of volatile Nitrosamines in various meat products using comprehensi ve gas Chromatography nitrogen chemiluminescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 48, (11), 3268-3273.
- Parthasarathy, D.K., Bryan, N.S., 2012. Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide Insufficiency. *Meat Science*, 92, (3), 274-279.
- Pirinççi, I., Acet, H., Bati, B., 1986. Sucuklarda N-nitrozamin bileşiklerinin gaz kromatografik yöntemle tayin edilmesi. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, (1), 75-89.
- Pei-Shan, C., Wan-Ru, Wang., Hsiu-Ling, C., Chung-Yu, C., Pei-Ru, Y., Trias, M., Ching Chang, L., 2024. İmpact of storage time and cooking methods on altering nitrate, nitrite and n-nitrosamine levels in processed meats. *önbaskı*.
- Polenske, E., 1891. Über den Verlust, welchen Rindfleisch and Nahrwert durch das Pökeln erleidet sowie über die Veränderungen salpeterhaltiger Pökellaken. *Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt*, 7, 471–474.
- Ramezani, H., Abhari, K., Pilevar, Z. Hosseini, H., Mohammadi, A., 2020. Volatile N-nitrosamine, residual nitrite, and ascorbic acid levels in sausages during storage. *Foods and Raw Materials*, (8), 28-33.
- Reinik, M., 2007. Nitrates, nitrites, N-nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in food: analytical methods, occurrence and dietary intake. TARTU University Ph.D. Thesis.

- Rincon, F., Martinez, B., Delgado, J.M., 2003. Detection of factors influencing nitrite determination in meat, *Meat Science*, 65, 1421-1427.
- Rywotycki R., 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry*, 101, 540-548.
- Rywotycki, R., 1998. The concentration of nitrosamines in pasteurized beef ham influenced by heat treatment and functional additives. *Med Weter*, 54 (8), 554-557.
- Rywotycki, R., 2002. The effect of selected additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham, *Meat Science*, 60, 335-339.
- Sallan, S., Kaban, G., Şişik, Ş., Çelik, M., Kaya, M., 2020. Nitrosamine formation in a semi-dry fermented sausage: Effects of nitrite, ascorbate and starter culture and role of cooking. *Meat Science*. 159.
- Scanlan, R.A., 1983. Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer Reserches*. May, (43), 2435-2440.
- Scheeren. M.B., Sabik, H., Gariépy, C., Terra, N.N., Arul, J., 2015. Determination of N-nitrosamines in processed meats by liquid extraction combined with gas chromatography-methanol chemical ionization mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part A*, 32, (9), 1436-1447.
- Sen, N. P., Donaldson, B. A., Seaman, S., Iyengar, J. R., Miles, W. F., 1976. Inhibition of nitrosamine formation in fried bacon by propyl gallate and L-ascorbyl palmitate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24,(2), 397–401.
- Sen, N. P., Seaman, S., Miles, W., F., 1979. Volatile nitrosamines in various cured meat products: effect of cooking and recent trends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27,(6), 1354–1357.
- Seo, J-e., Park, J-e., Lee, Y., Do. B., Lee, J-y., Kwon, H., 2022. Effect of cooking method on the concentrations of volatile N-nitrosamines in various food products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, (7), e16590.
- Sebranek, J. G., Bacus, J. N., 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues?, *Meat Science*, 77, (1), 136-147.
- Shahidi, F., Pegg, R.B., Sen, N.P., 1994. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. *Meat Science*, 37, (3), 327-336.
- Shalaby, A. R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, (7), 675–690.
- Siyang, D., Shuo, S., Xiufang, X., 2022. Effect of plant polyphenols on the physicochemical properties, residual nitrites, and N-nitrosamine formation in dry-fried bacon. *Meat Science*, (191), 77-84.
- Sırıken, B., Özdemir, M., Yavuz, H., Pamık, Ş., 2006. The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in Turkish sausage (soudjouk) produced in Afyon Province, Turkey, *Food Control*, (17), 923-928.
- Suman, S. P., Joseph, P., 2013. Myoglobin chemistry and meat color, *Annual Review of food Science and Technology*, (4), 79-99.
- Turantaş, F., Kılıç G.B., Kılıç, B., 2015. Ultrasound in the meat industry: general applications And decontamination efficiency, *International Journal of Food Microbiology*, (198), 59-69.
- Tricker, A.R., Preussmann, R., 1991. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259 (3-4), 277-289.

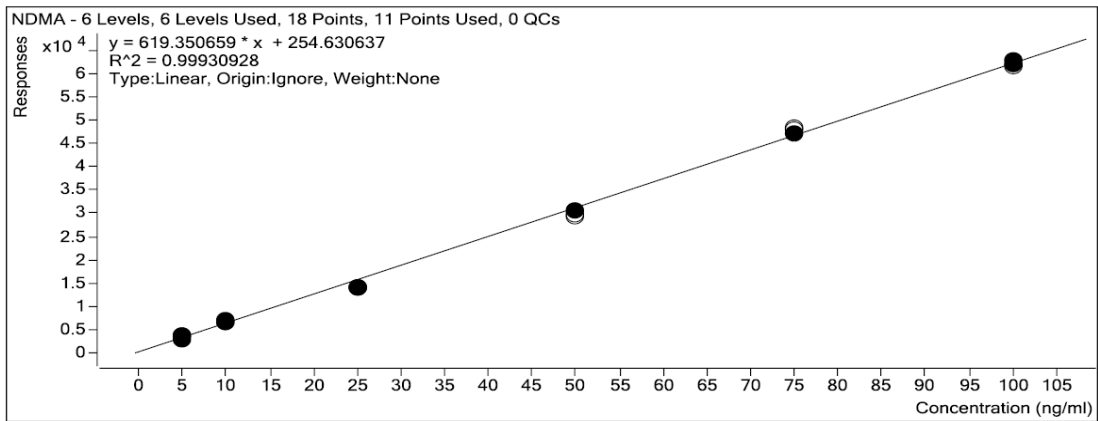
- Ventanas S., Martin D., Estevez M., Ruiz J., 2006. Analysis of volatile nitrosamines from a model system using SPME-DED at different temperatures and times of extraction, Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry, (99), 842-850.
- Wei, F., Xu, X., Zhou, G., Zhao, G., Li C., Zhang, Y., Chen, L., Qi, J., 2009. Irradiated Chinese Rugao ham: Changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening, Meat Science, (81), 451-455.
- Walker, E.A., Pignatelli, B., Castegnaro, M., 1975. Effects of gallic acid on nitrosamine Formation. Nature, 258 (5531), 176.
- Wang, Y., Li, F., Zhuang, H., Chen, X., Li, L., Qiao, W., Zhang, J., 2015. Effects of plant polyphenols and α -tocopherol on lipid oxidation, residual nitrites, biogenic amines and N-nitrosamines formation during ripening and storage of dry-cured bacon. LWT-Food Science and Technology, (60) 199-206.
- Wang, W., Kou, Y., Du, Y., Li, M., Zhang, J., Yan, A., Xie, J., Shen, M. 2023. Investigation On the Contents of N-carboxymethyllysine, N-carboxyethyllysine, and N-nitrosamines in Commercial Sausages on the Chinese Market. Foods. 12 (4), 724.
- Warthesen, J.J., Scanlan, R.A., Bills, D.D., Libbey, L.M., 1975. Formation of Heterocyclic N- nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino Acids. Journal Agricultural Food Chemistry, 5 (23), 898-902.
- Xiao, Y., Zhou, Y., Ma, F., Chen, C., 2018. Effect of inoculating *Lactobacillus pentosus* R3 on N-nitrosamines and bacterial communities in dry fermented sausages. Food control, (87), 126-134.
- Yıldırım, Y., 1979. Nitrat ve nitritin et ürünlerine katılma oranlarının sınırlandırılması. Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi. 2, (1), 71-77.
- Yingfeng, X., Yaqian, G., Jimbo, Yao., 2023. N-nitrosamines in processed meats: Exposure, formation and mitigation strategies. Journal of Agriculture and Food Research, 13(2)
- Yuan, Y., Meng, W., Yutga, M., Fang, C., Xgaosong, H., 2015. Determination of eight volatile nitrosamines in meat products by ultrasonic solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry method. International Journal of Food Properties, 18,(6), 1181-1190.
- Yurchenko, S., Mölder U., 2007. The occurrence of volatile n-nitrosamines in Estonian meat products. Food Chemistry (100), 1713–1721.
- Zeng, P. Ruan, Q. Zhang, Y., 2018. Effect of drying temperature and presalting methods on the quality and N-nitrosamine formation of dried mud carp (*Cirrhinus molitorella*). Journal Food Process and Preservation, 8, (42), 67-71.
- Zhou, G., H., Xu, X. L., Liu, Y., 2010. Preservation Technologies for fresh meat, a review, Meat Science, (86), 119-128.

7. EKLER

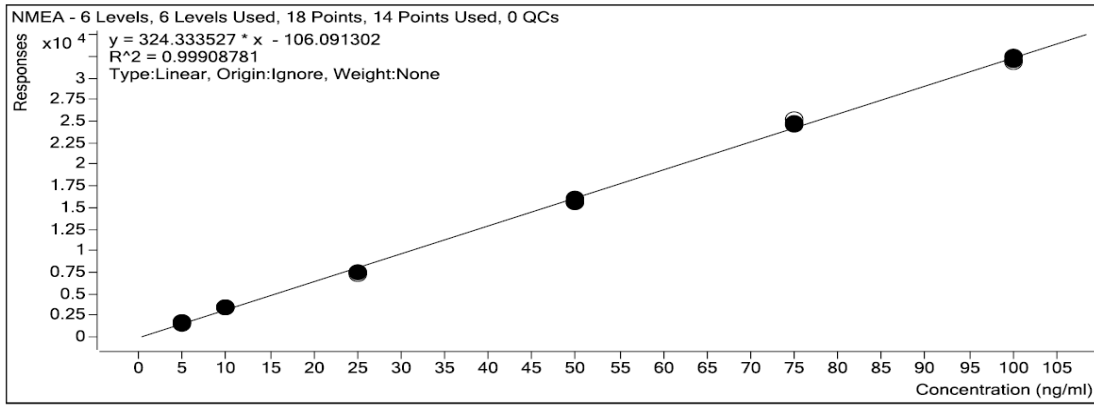
7.1. EPA 521 N-nitrozamin Standardına ait LC-MS/MS kromatogramı.



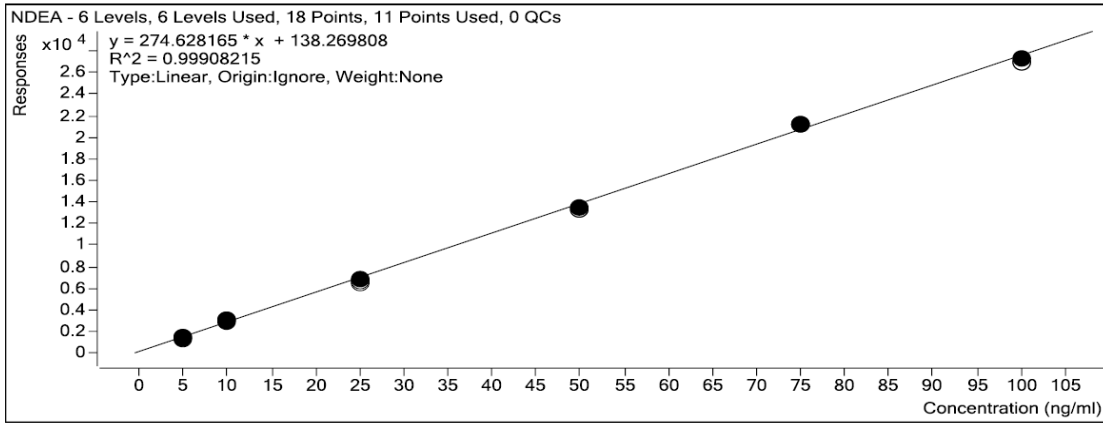
7.2. N-nitrozamin türevlerine ait kalibrasyon eğrileri



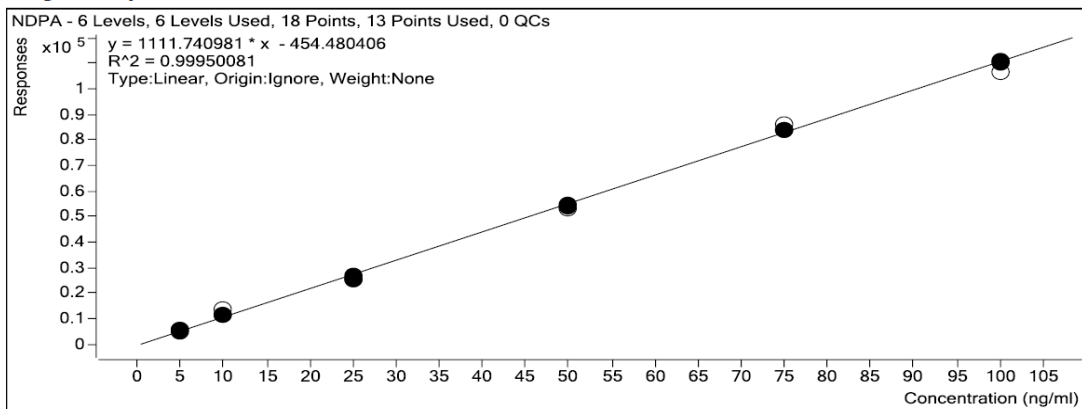
NDMA Kalibrasyon Eğrisi



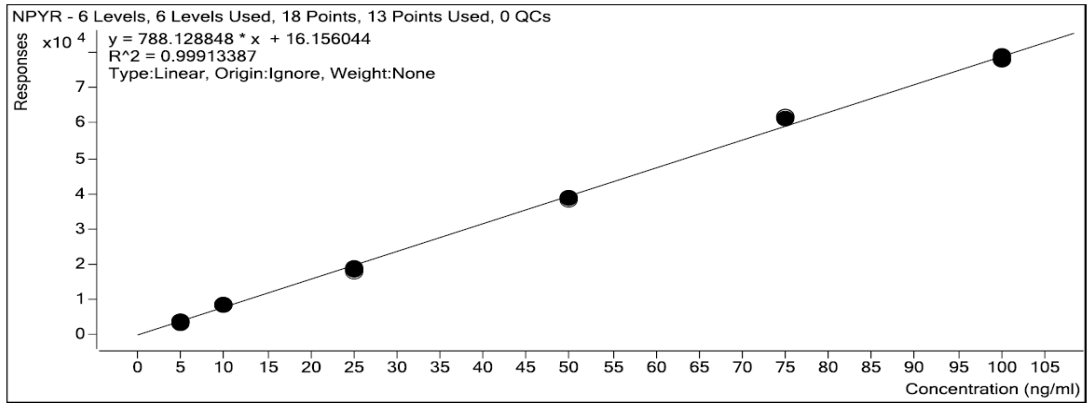
NMEA Kalibrasyon Eğrisi



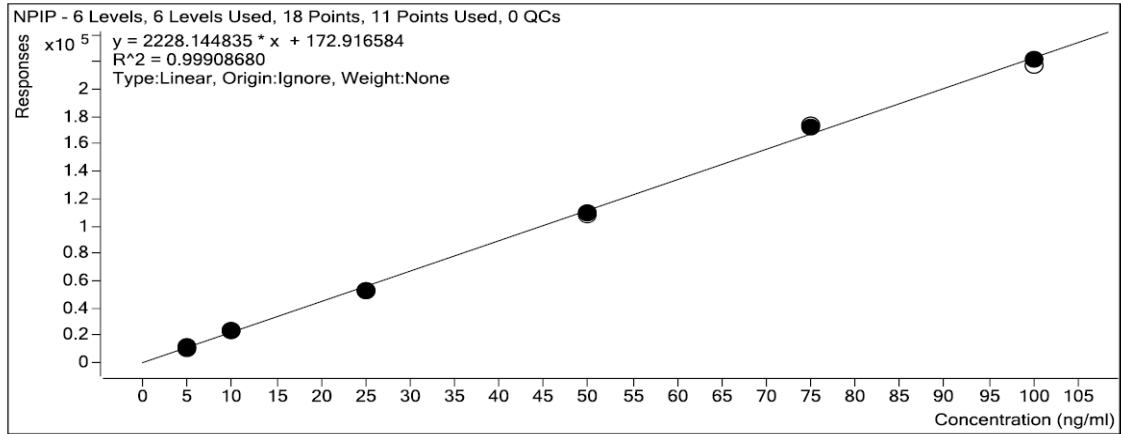
NDEA Kalibrasyon Eğrisi



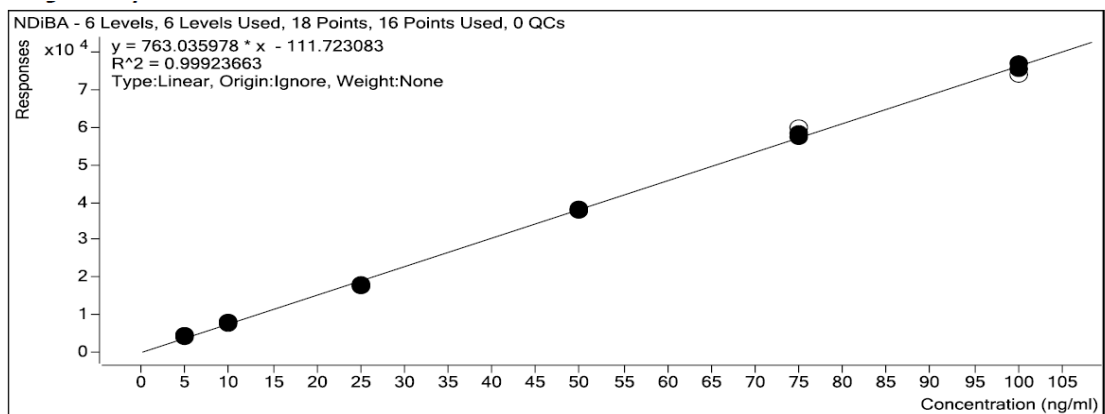
NDPA Kalibrasyon Eğrisi



NPYR Kalibrasyon Eğrisi

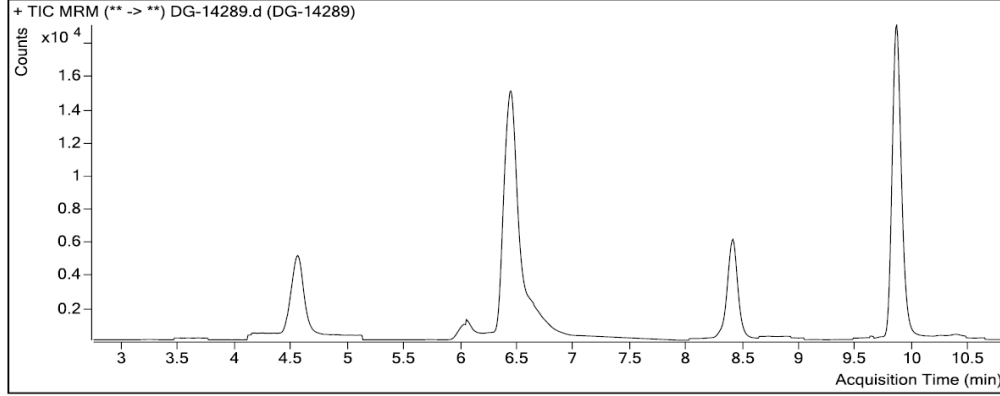


NPIP Kalibrasyon Eğrisi

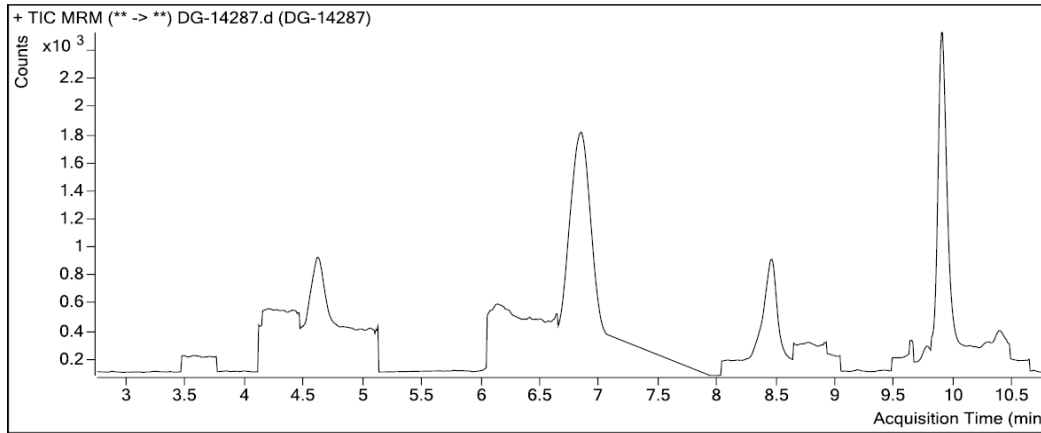


NDiBA Kalibrasyon Eğrisi

7.3. Spike Numunelerine Ait Kromotogramlar



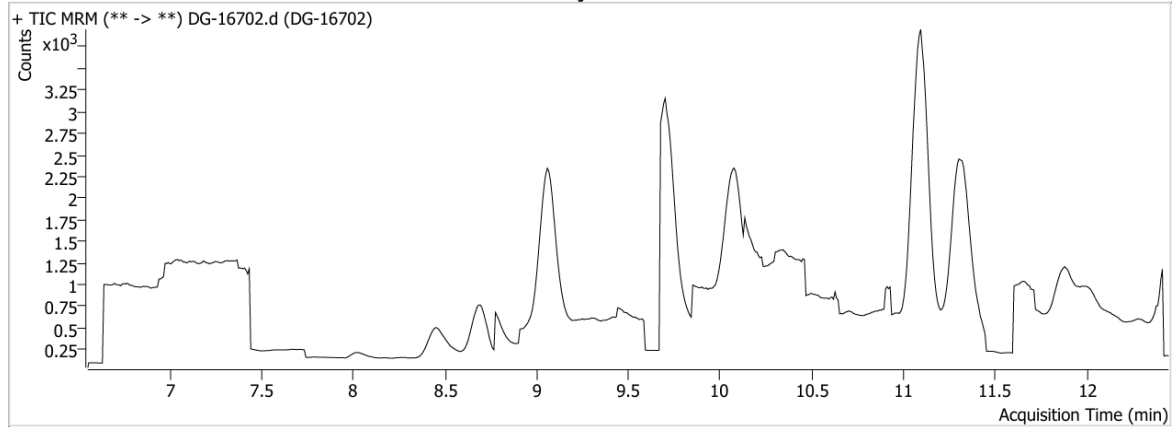
50 µg/kg standart madde ile zenginleştirilmiş spike numunesine ait kromotogram



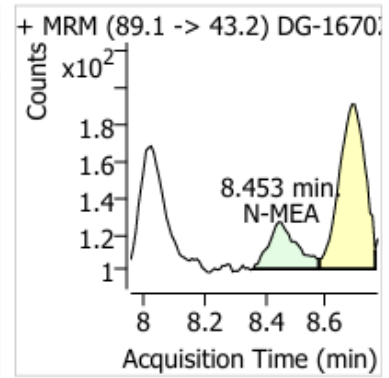
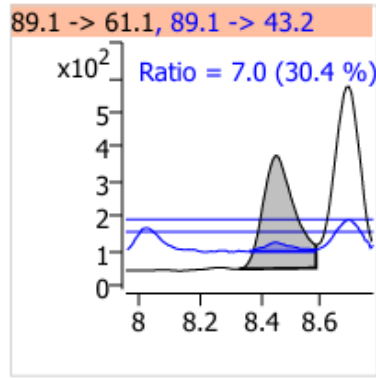
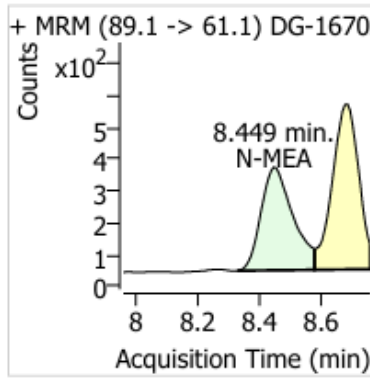
100 µg/kg standart madde ile zenginleştirilmiş spike numunesine ait kromotogram

7.4. % 0.05 Askorbik Asit İlaveli Sucuk Örneklerine Ait Kromotogramlar

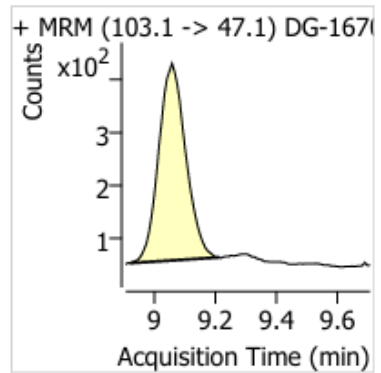
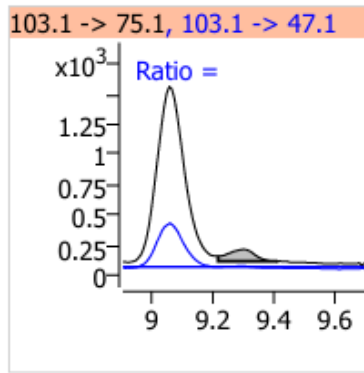
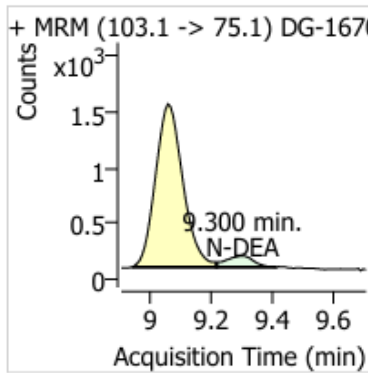
% 0.05 askorbik asit ilaveli örneklere ait kromotogramlardan örnekler aşağıda verilmiştir.



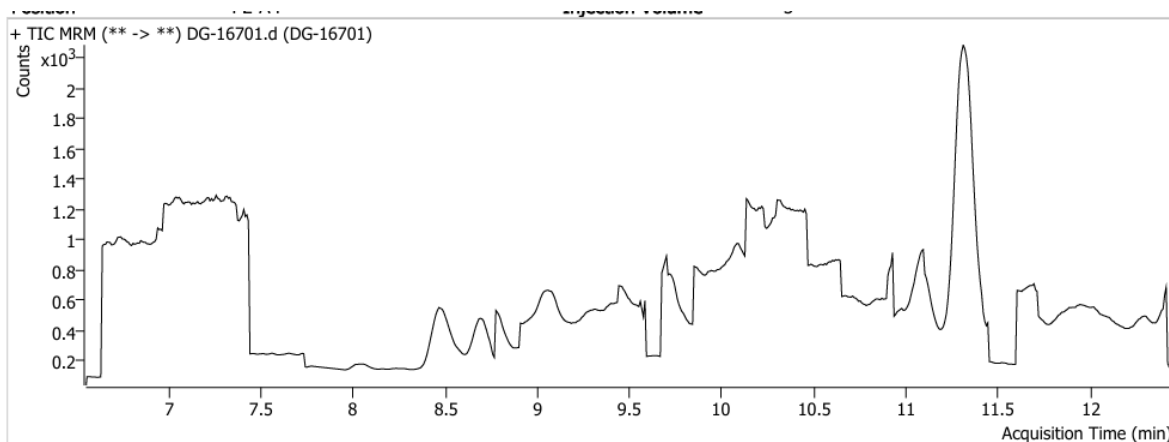
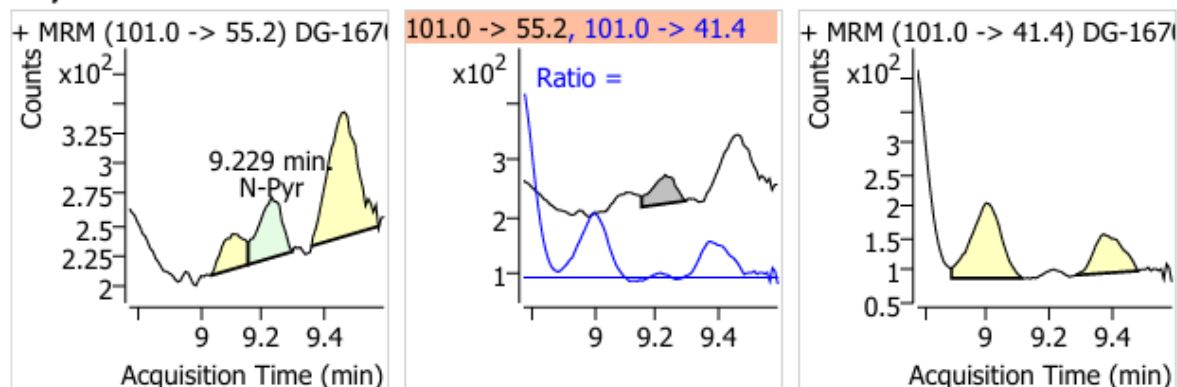
N-MEA



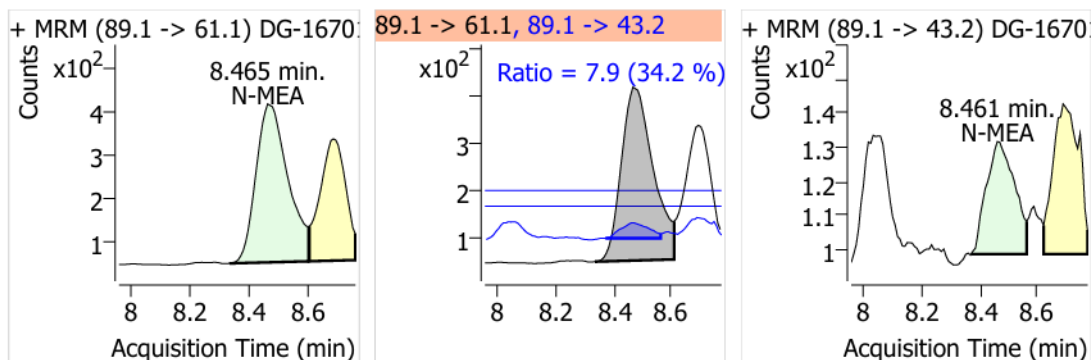
N-DEA



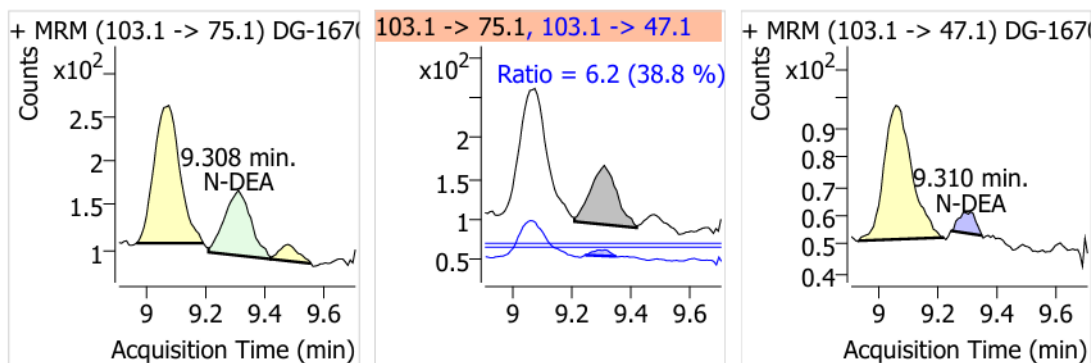
N-Pyr

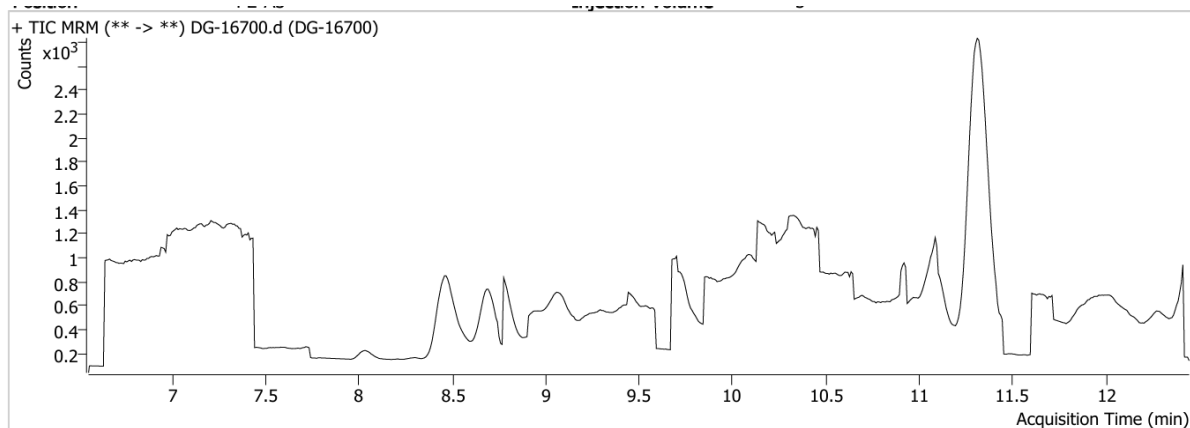


N-MEA

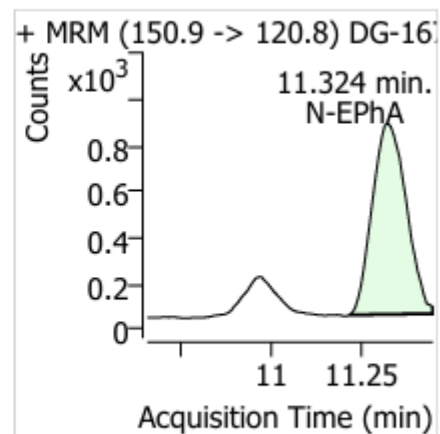
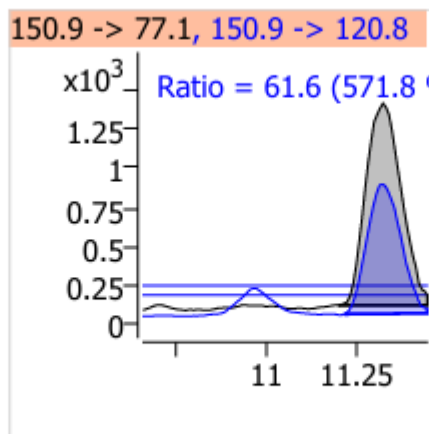
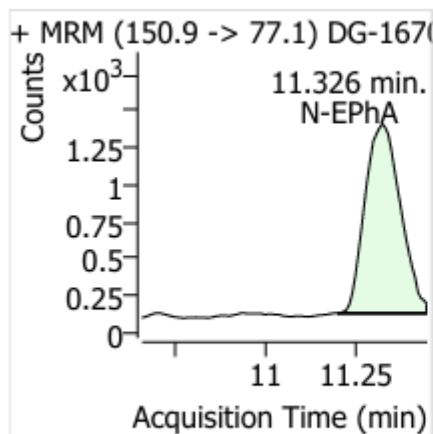


N-DEA

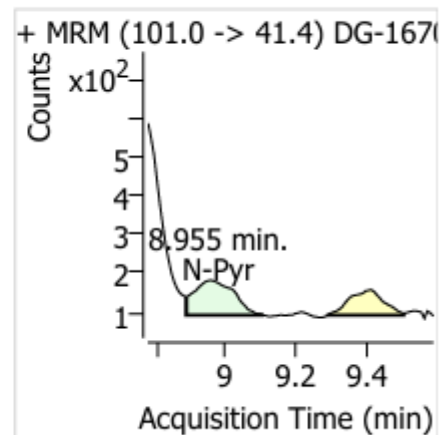
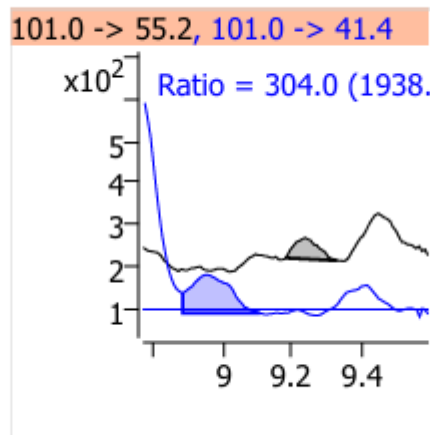
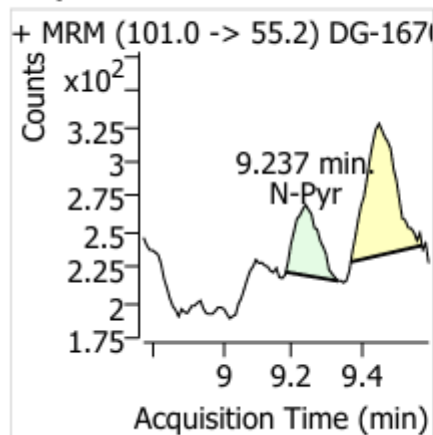




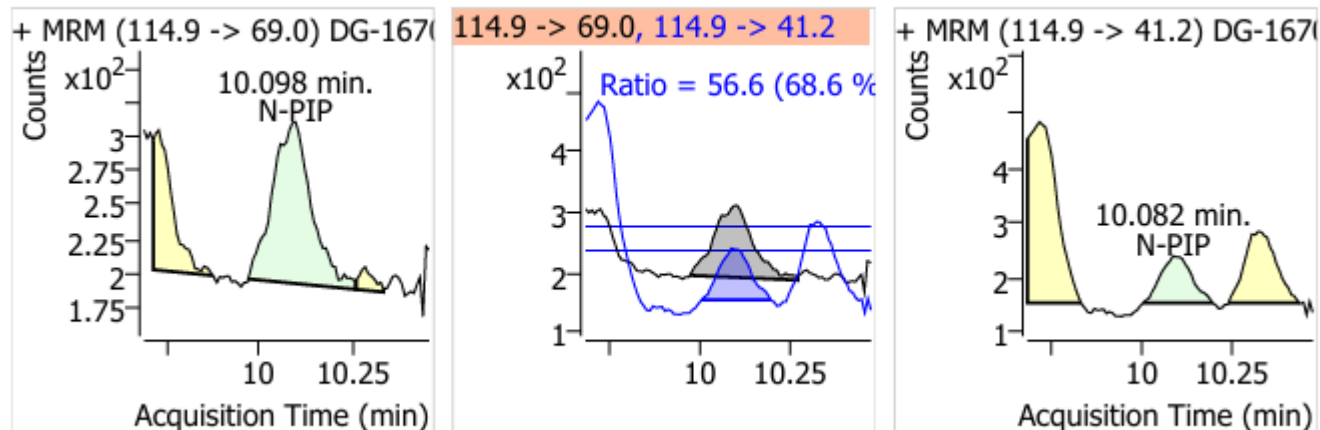
N-EPhA



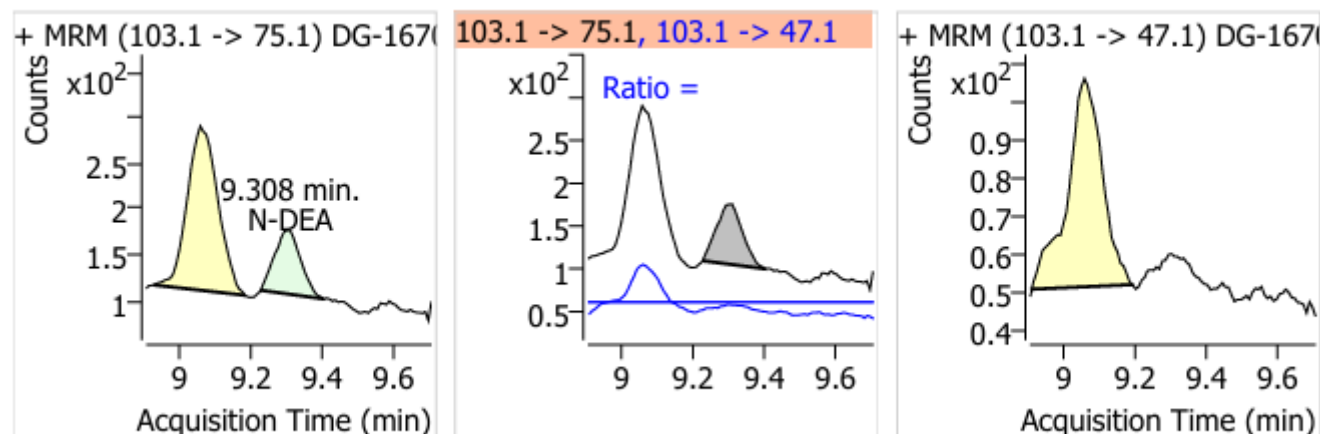
N-Pyr



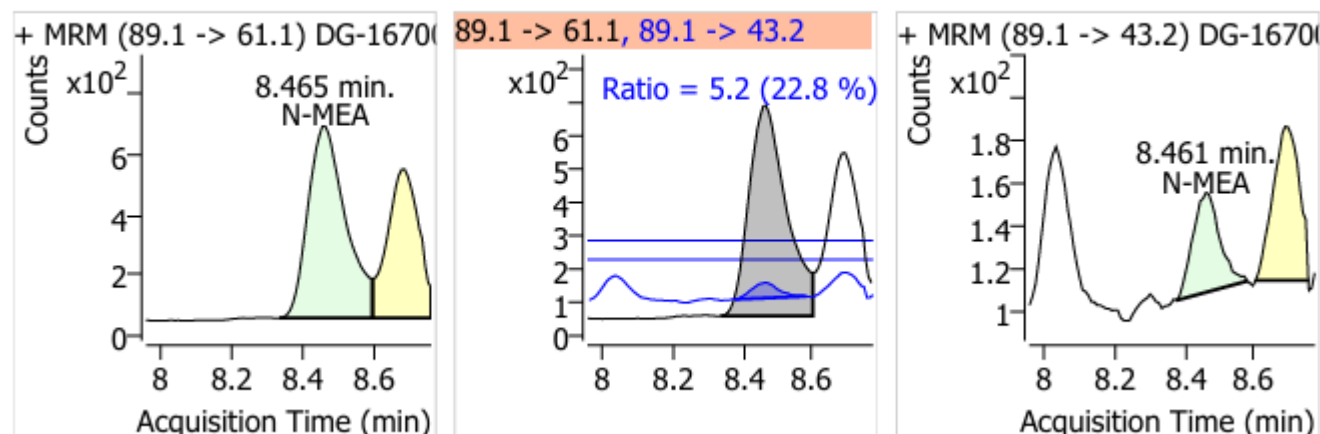
N-PIP

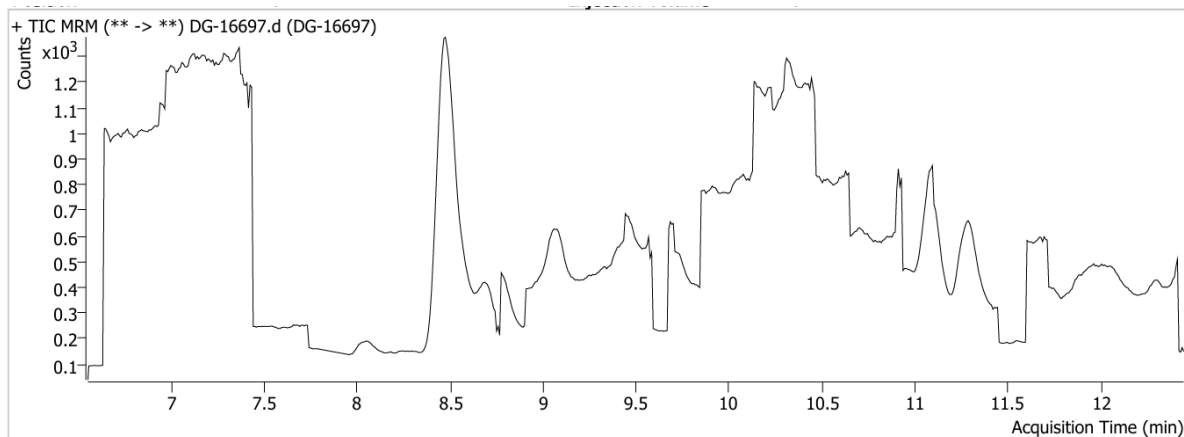


N-DEA

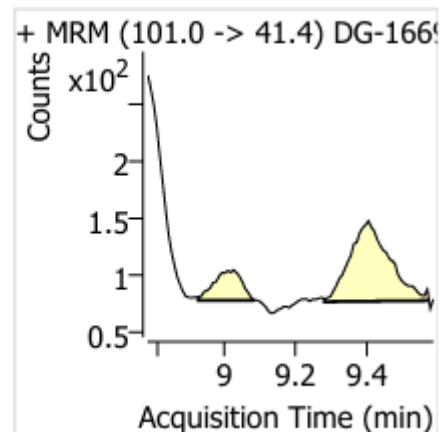
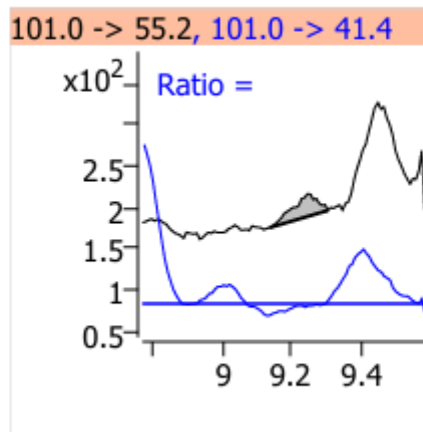
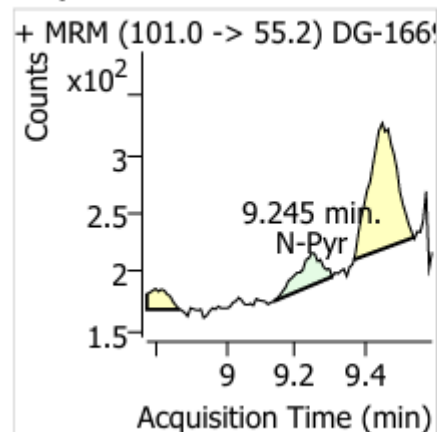


N-MEA

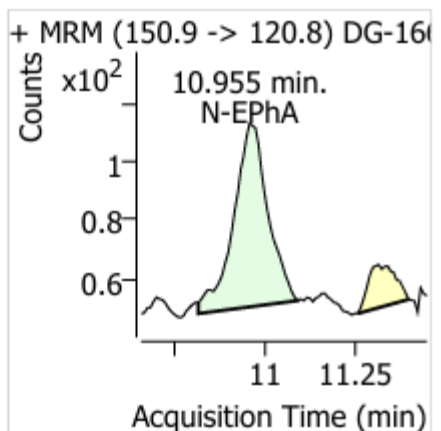
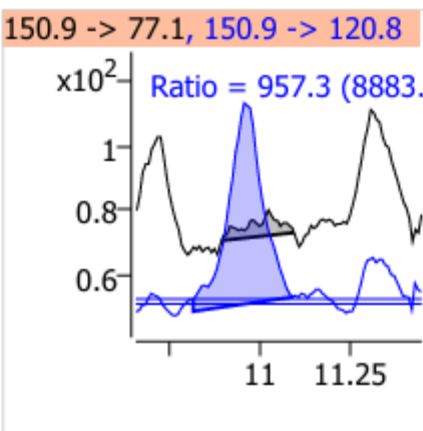
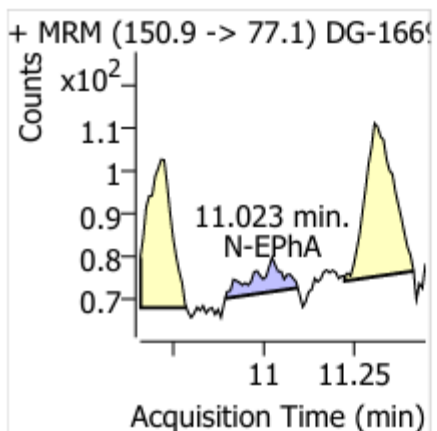




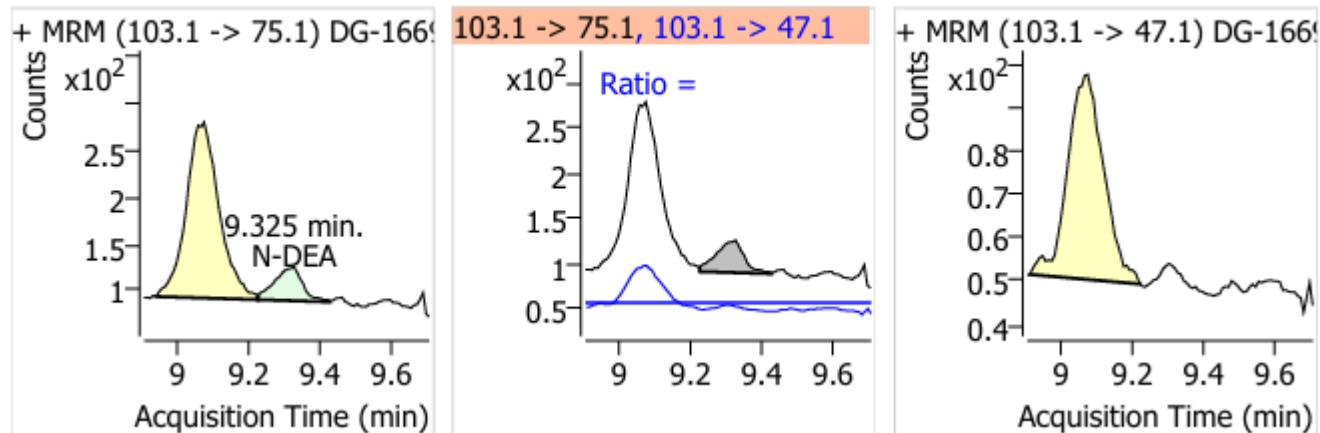
N-Pyr



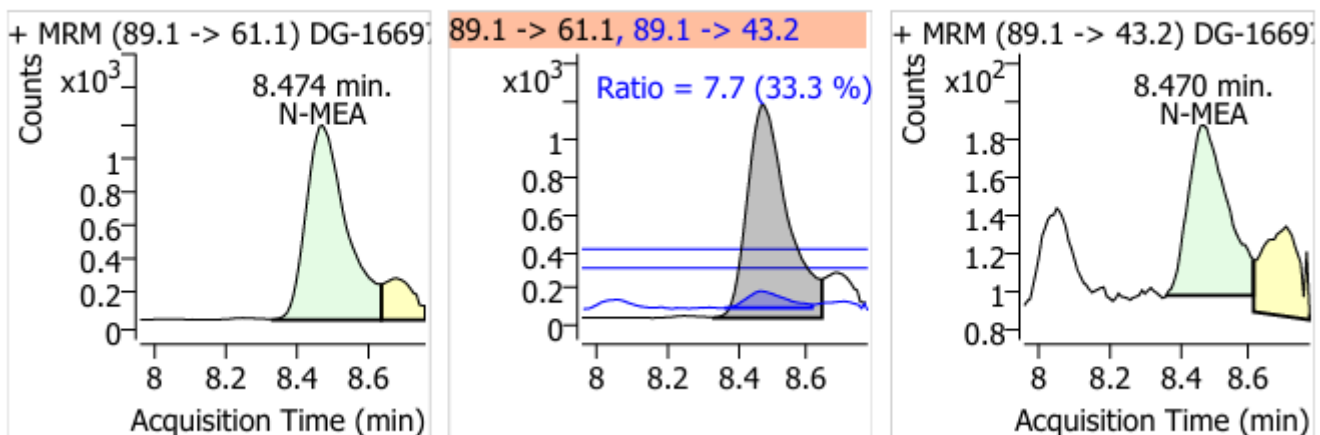
N-EPhA



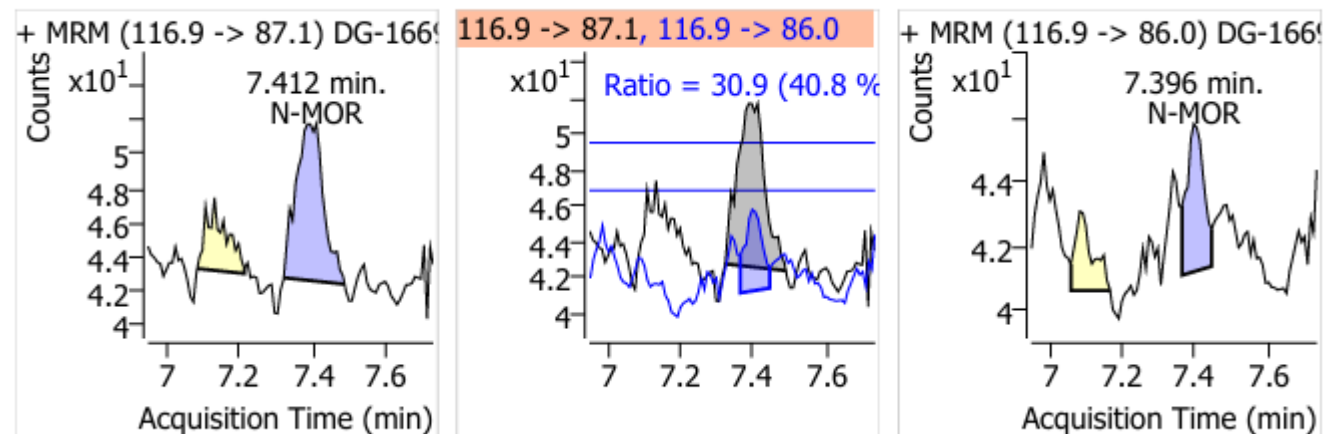
N-DEA

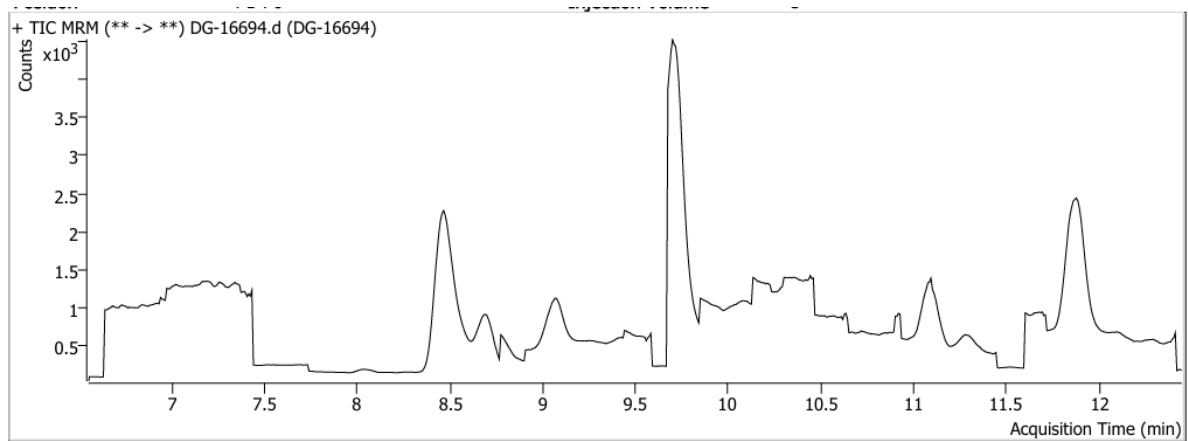


N-MEA

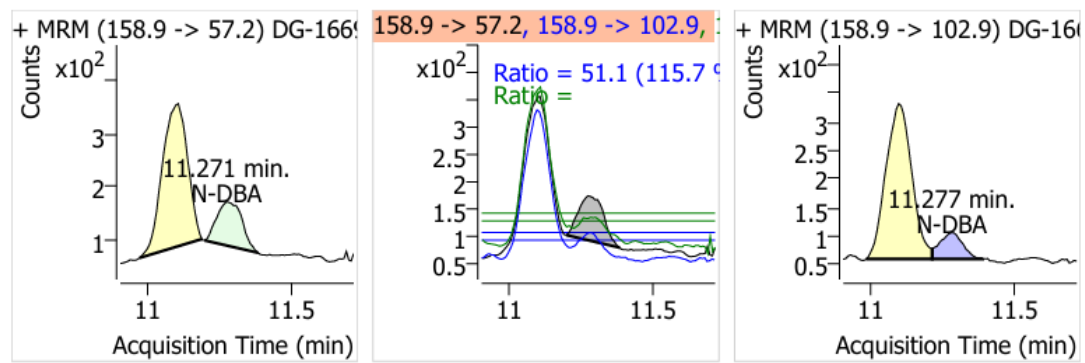


N-MOR

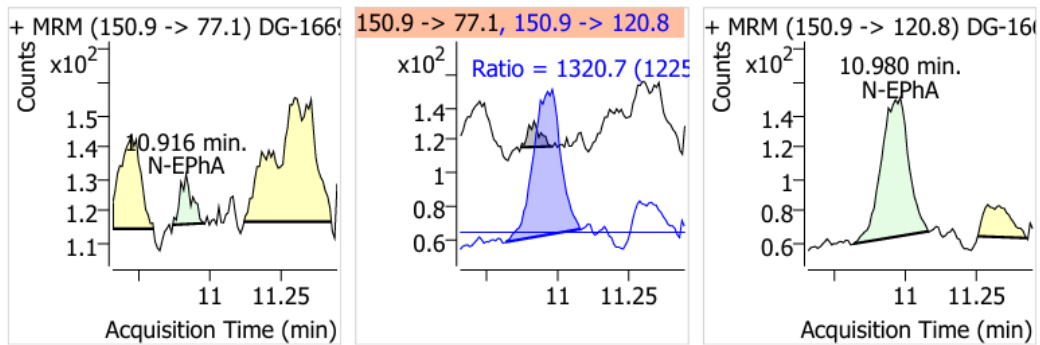




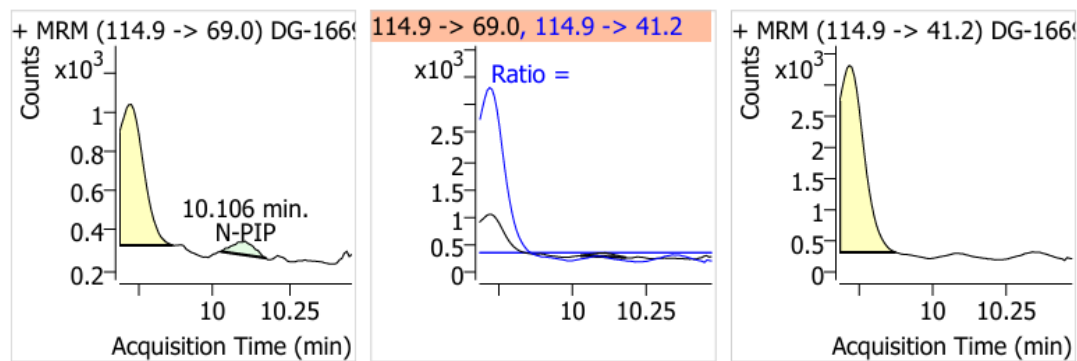
N-DBA



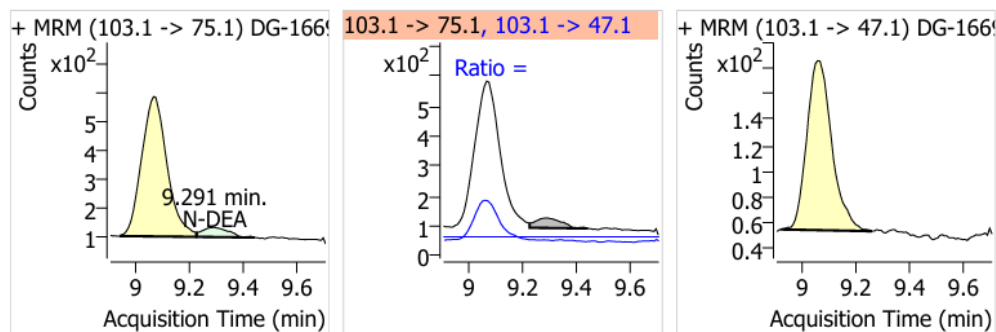
N-EPhA



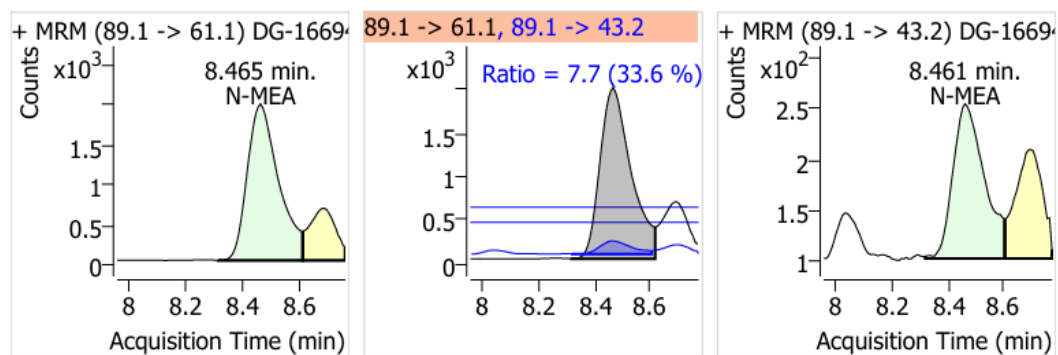
N-PIP



N-DEA

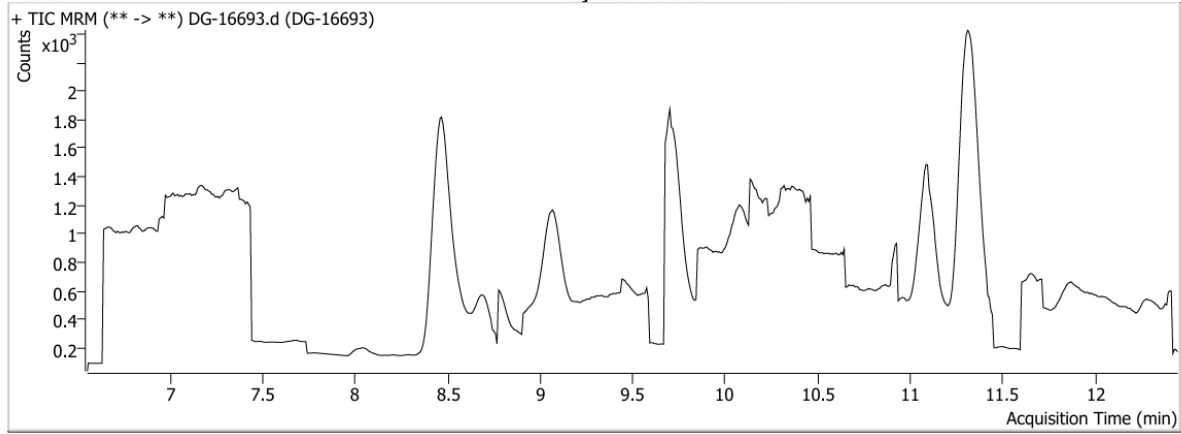


N-MEA

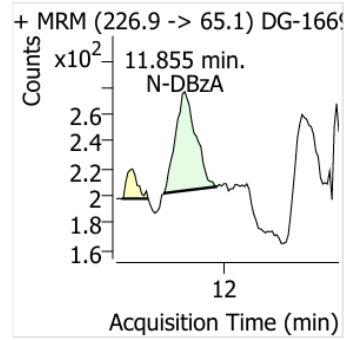
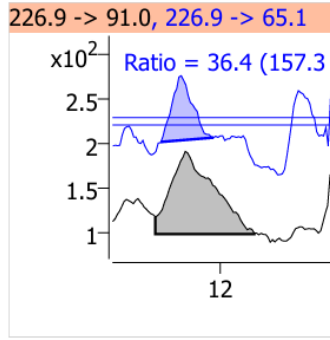
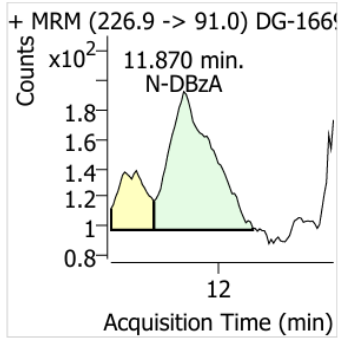


7.5. % 0.1 Askorbik Asit İlaveli Örneklerle Ait Kromotogramlar

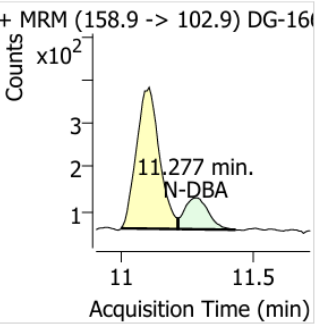
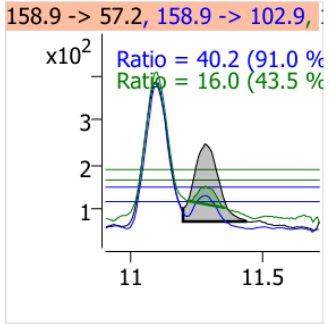
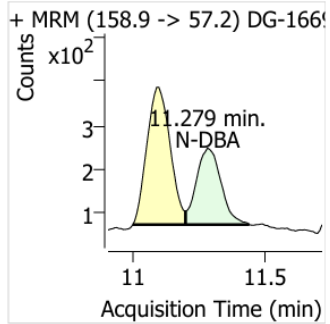
% 0.1 askorbik asit ilaveli örneklerle ait kromatogramlardan örnekler aşağıda verilmiştir.



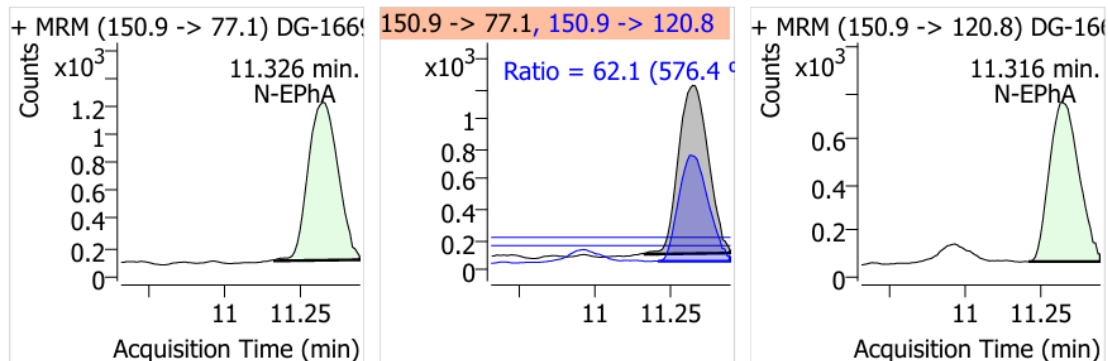
N-DBzA



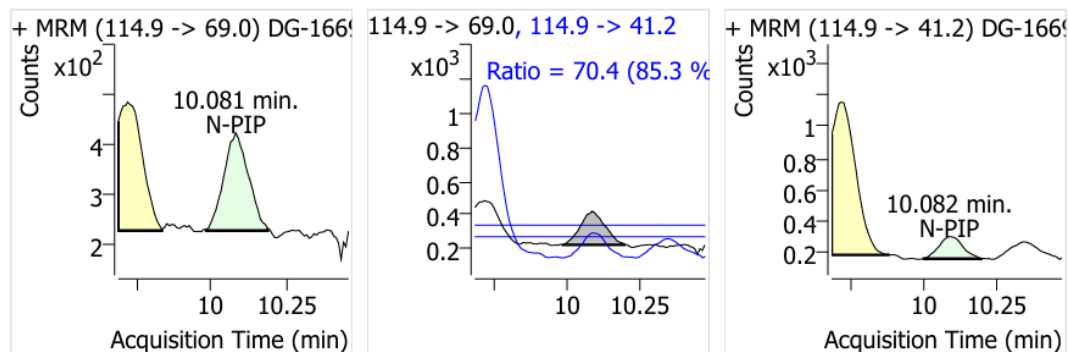
N-DBA



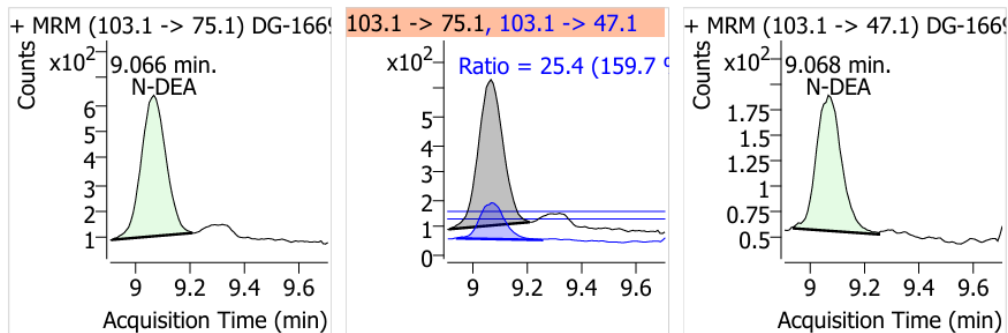
N-EPhA



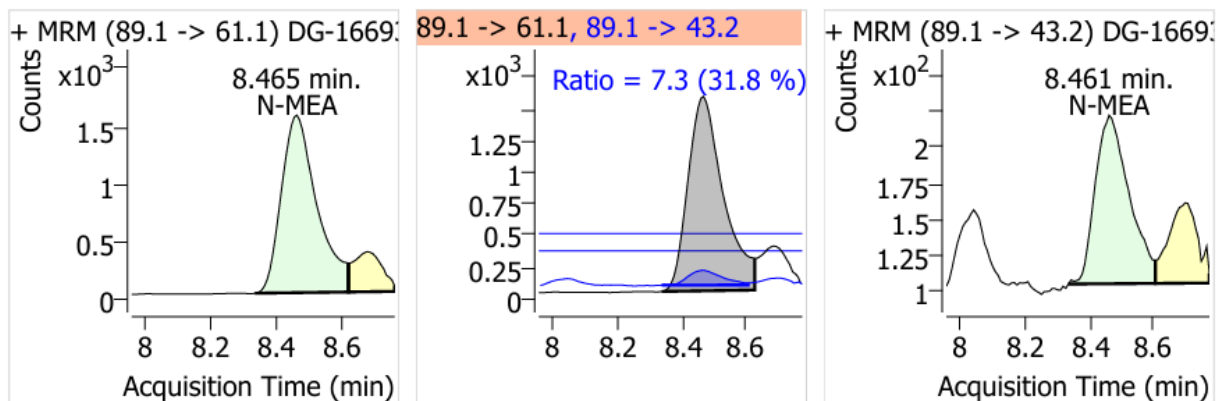
N-PIP

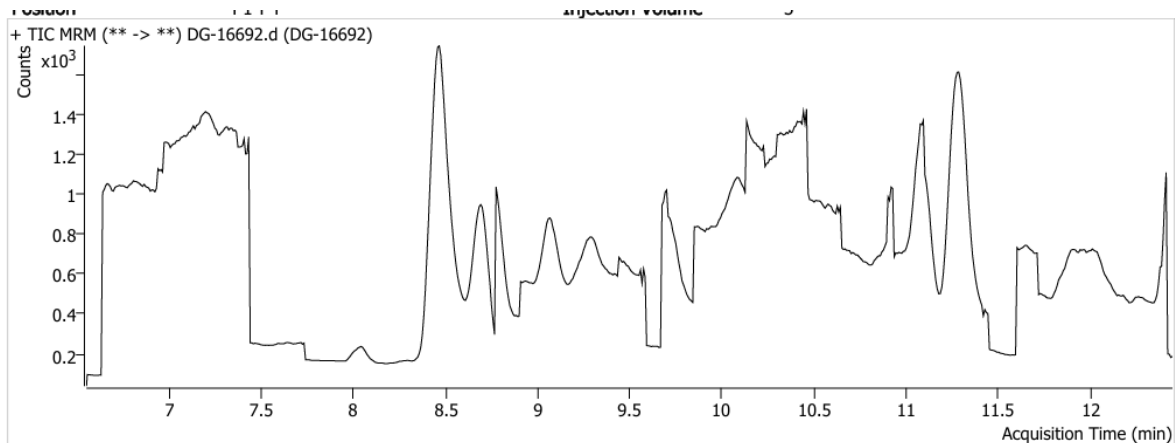


N-DEA

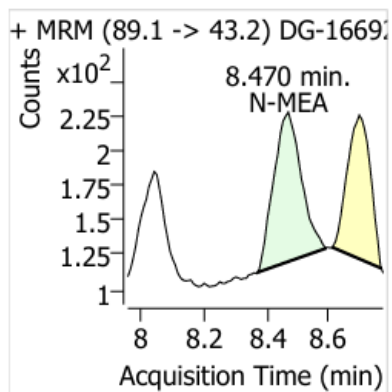
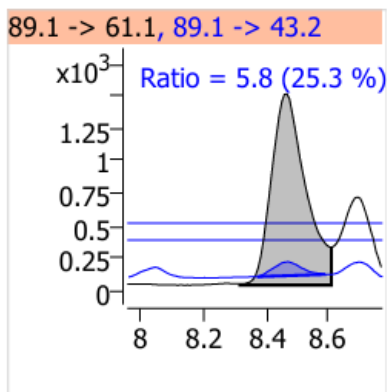
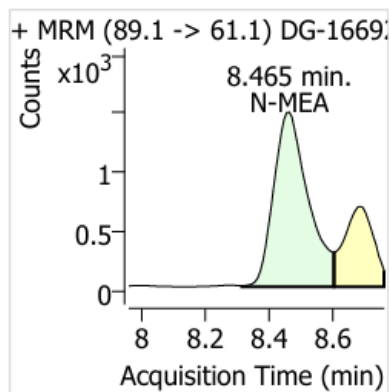


N-MEA

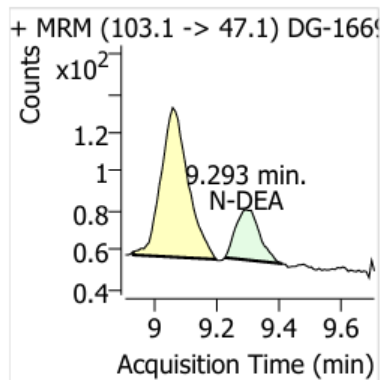
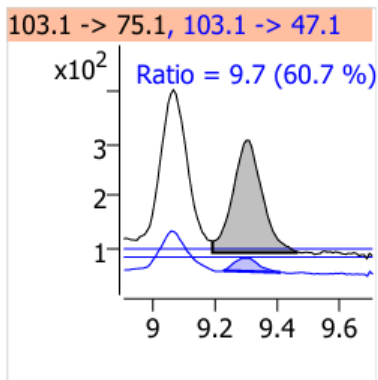
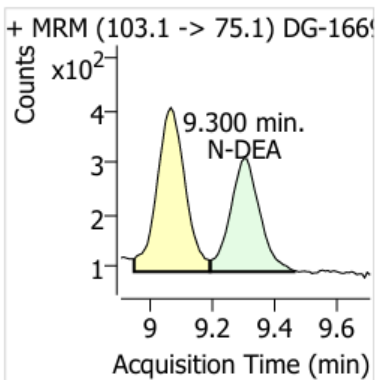




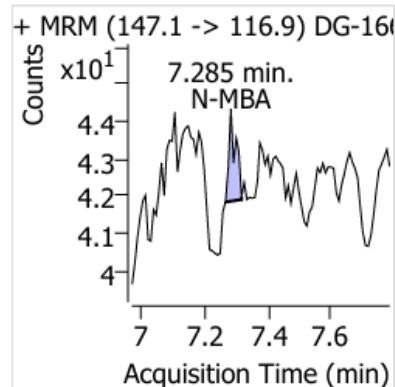
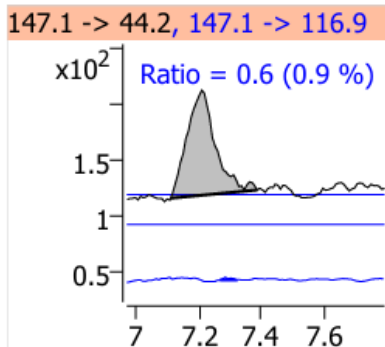
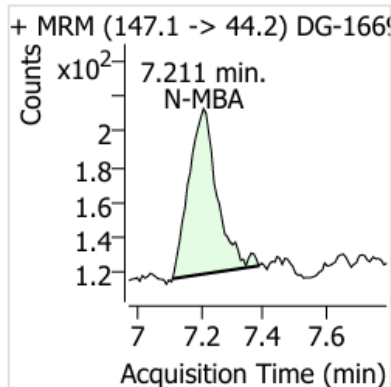
N-MEA



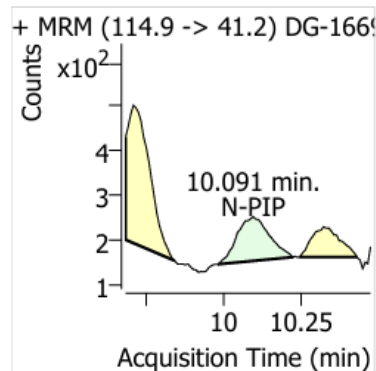
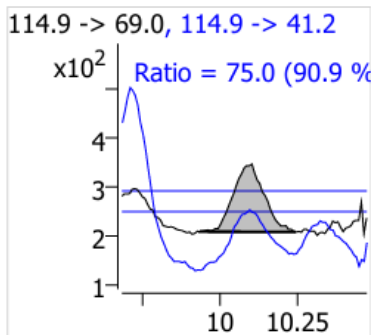
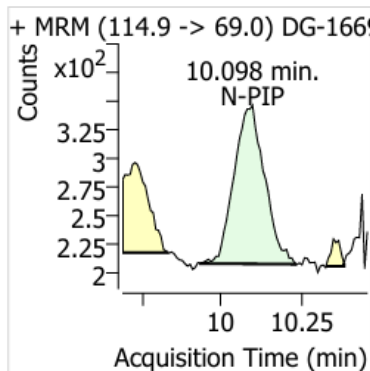
N-DEA



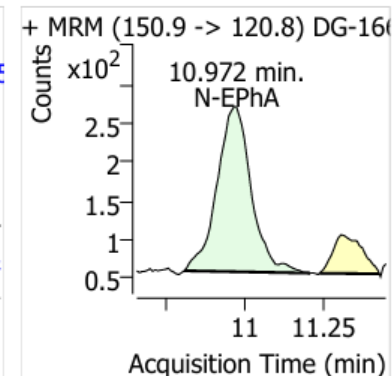
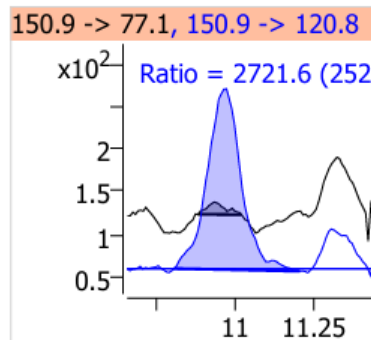
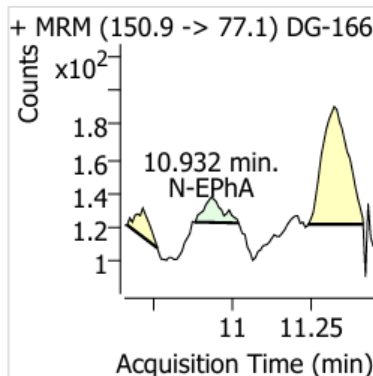
N-MBA



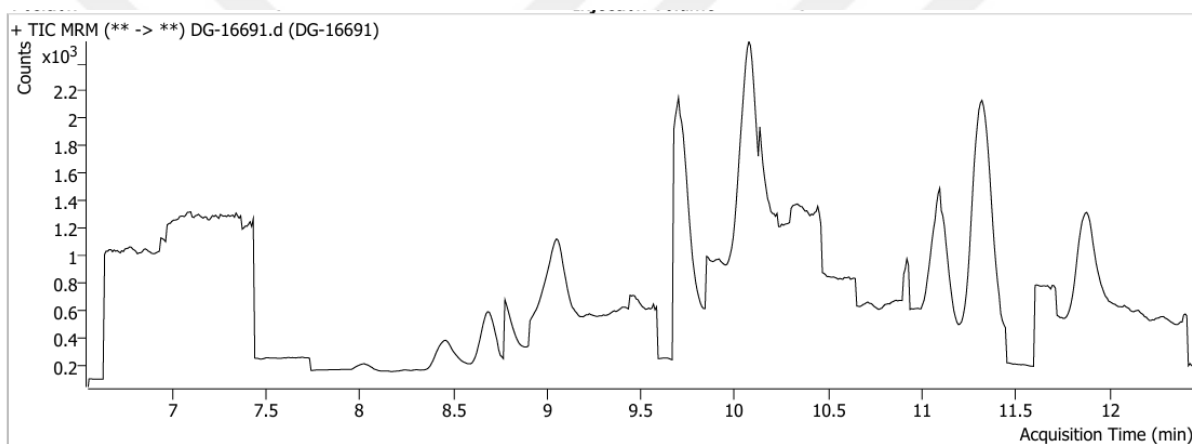
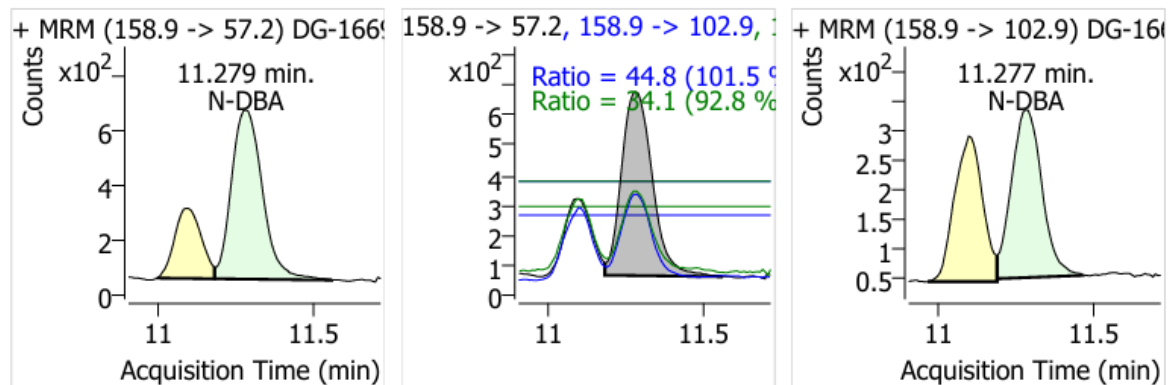
N-PIP



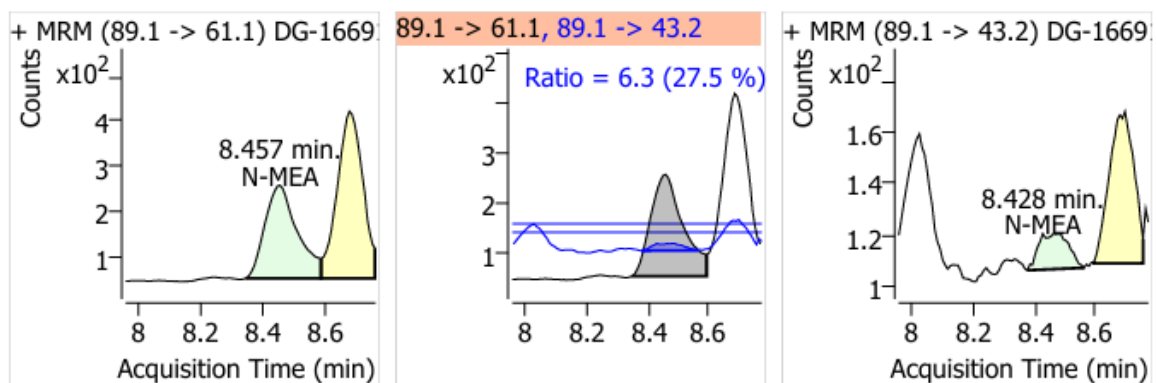
N-EPhA



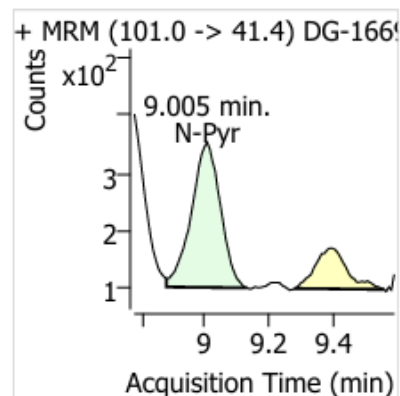
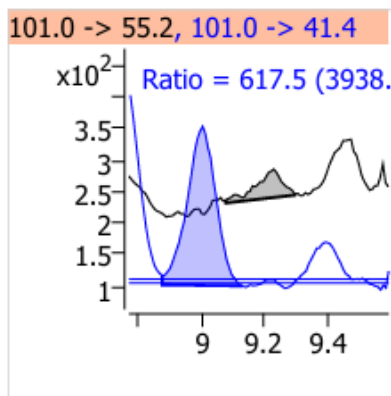
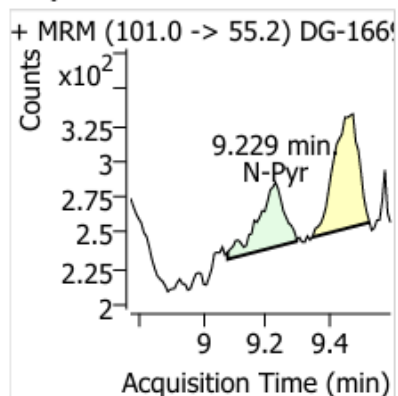
N-DBA



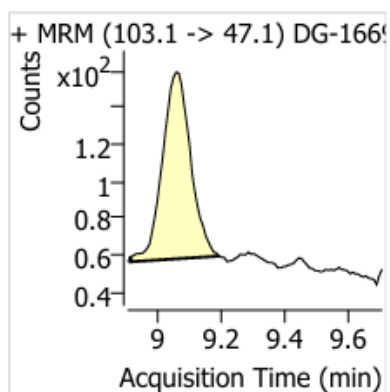
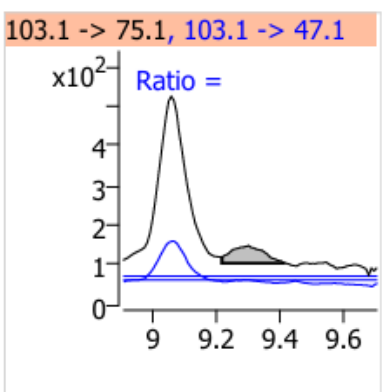
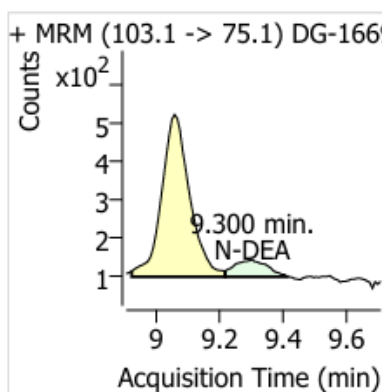
N-MEA



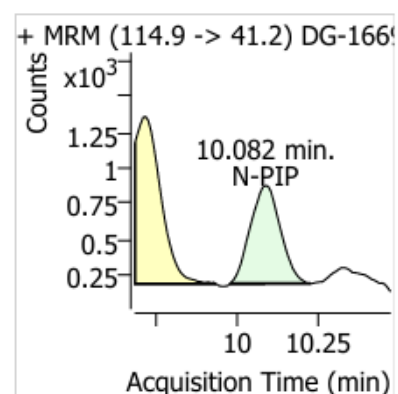
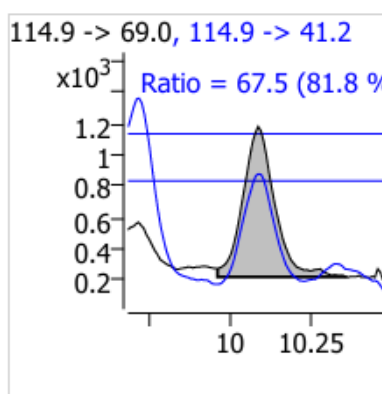
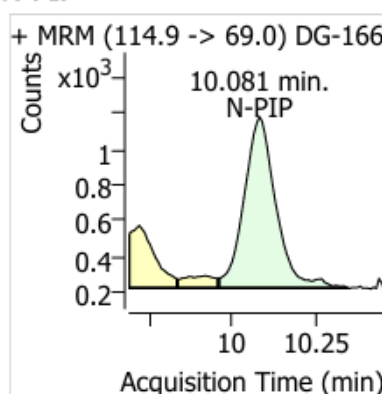
N-Pyr



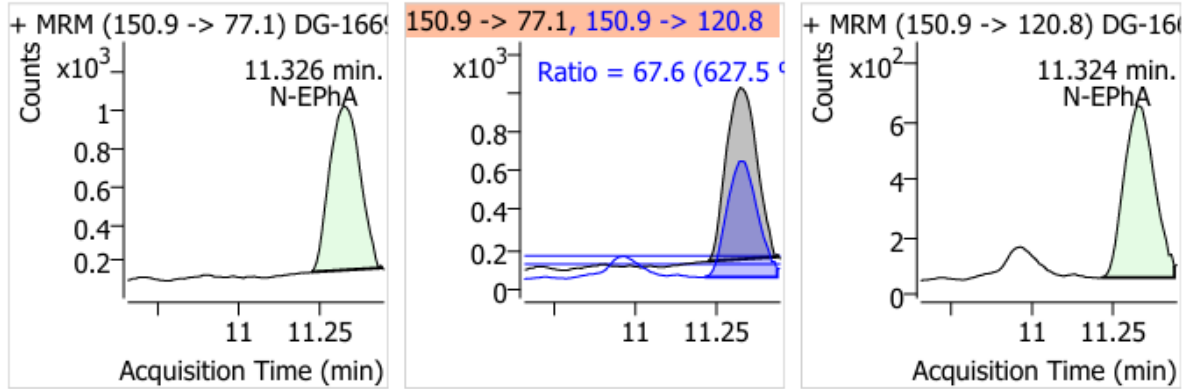
N-DEA



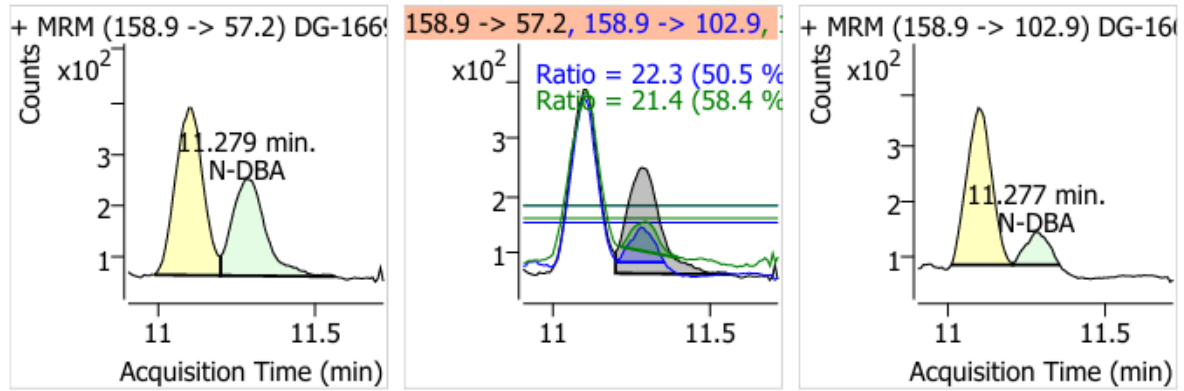
N-PIP



N-EPhA

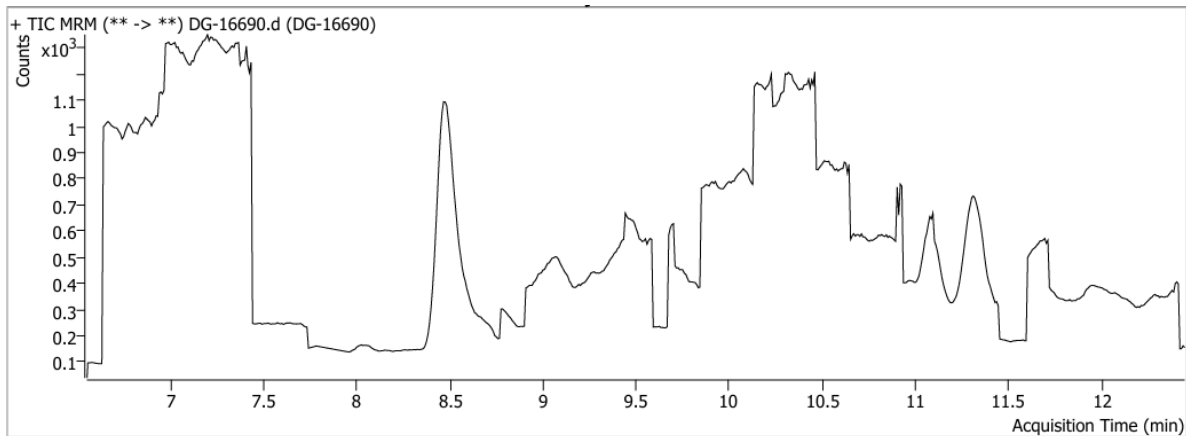


N-DBA

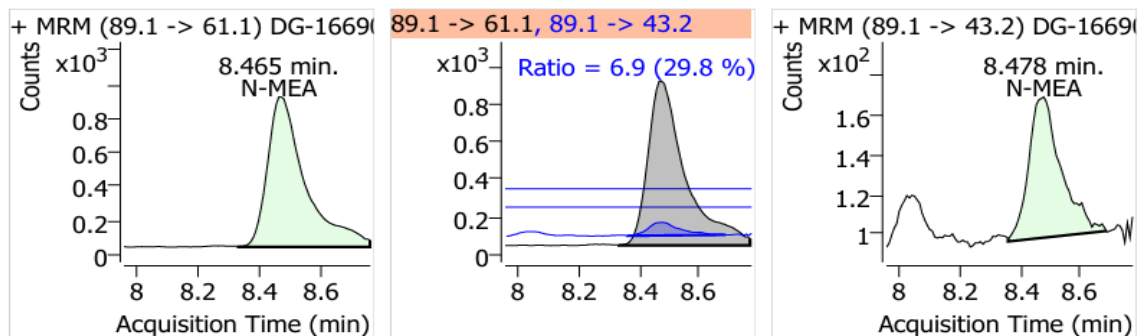


7.6. % 0.15 Askorbik Asit İlaveli Örneklerin Bir Kısımına Ait Kromotogramlar

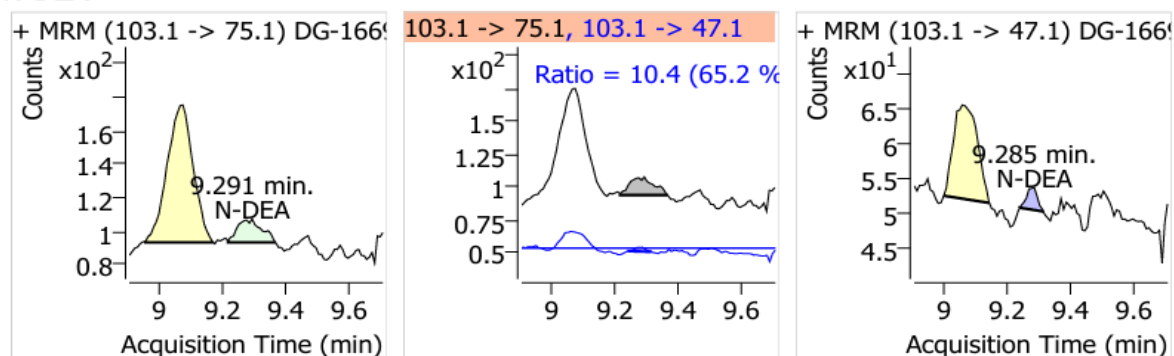
% 0.15 askorbik asit ilaveli örneklere ait kromotogramlardan örnekler aşağıda verilmiştir.



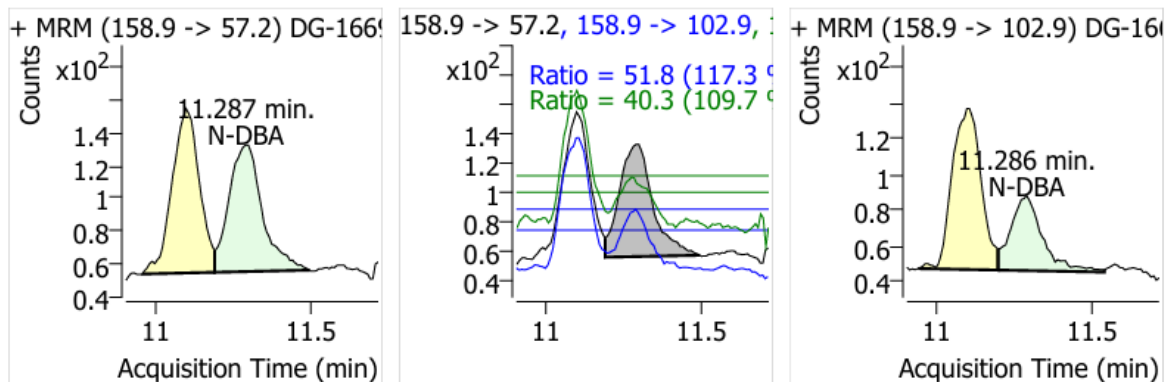
N-MEA



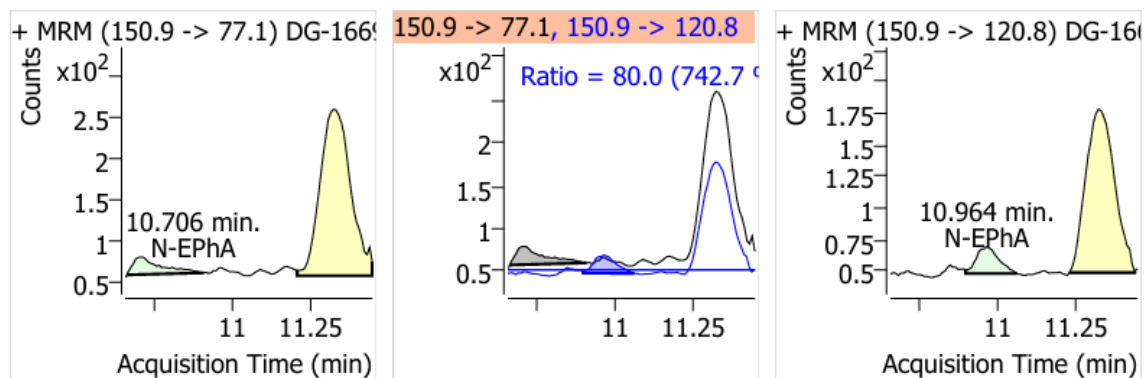
N-DEA



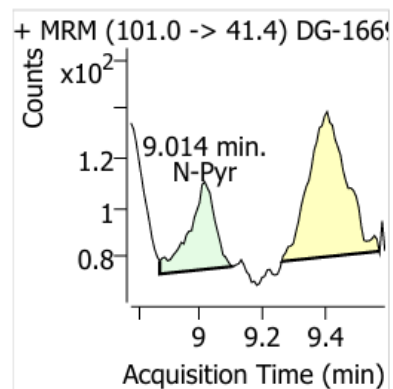
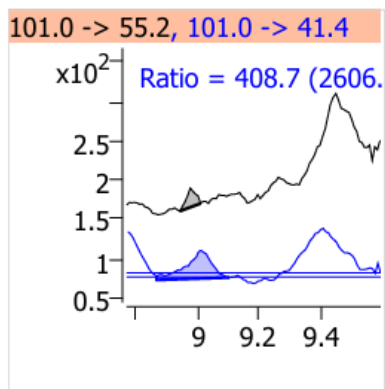
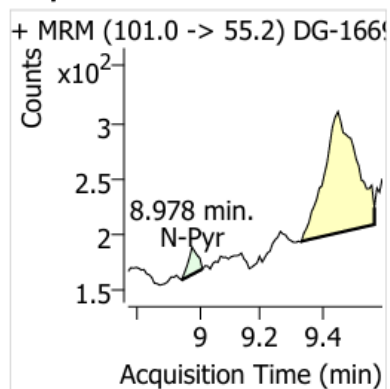
N-DBA



N-EPhA



N-Pyr



8. ÖZGEÇMİŞ

