



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OLGUNLAŞMA ESNASINDA BEYAZ PEYNİRDE OLUŞAN
BİOJEN AMİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

Derya GÜNEY

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ

II. Danışman

Yrd.Doç.Dr. Mehmet ALTUN

Aralık, 2009

İSTANBUL

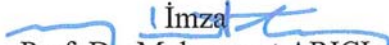
Bu çalışma 15/12/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



İmza

Adı Soyadı(Danışman)
Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ
İstanbul Üniversitesi
Kimya Anabilim Dalı



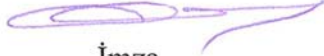
İmza

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Namık Kemal Üniversitesi
Ziraat Fakültesi



İmza

Prof. Dr. Cemil İBİŞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



İmza

Prof. Dr. Ayşe YUSUFOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



İmza

Prof. Dr. Serpil GÖKSEL
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ'a, aynı süre boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı Yrd. Doç. Dr. Mehmet ALTUN ve aramızdan ayrılan değerli hocam Prof. Dr. Hacı ORAK'a, yardımlarını esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sevim KÖSE' ye, Rize Üniversitesi Su Ürünleri fakültesi öğretim üyesi Arş. Gör. Serkan KORAL'a ve İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Organik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteğini benden esirgemeyen sevgili aileme, dostlarıma, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Eurolab Gıda ve Laboratuvar Hizmetleri Dış Ticaret A.Ş.' ye teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2009

Derya GÜNEY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
ÖZET.....	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. PEYNİR TANIMI VE ÖNEMİ	2
2.2 BİOJEN AMİNLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	5
2.3 BİOJEN AMİN OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	8
2.3.1 Sıcaklık ve pH'ın Etkisi	8
2.3.2. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi	9
2.3.3. Starter Kültürlerin Etkisi	9
2.3.4. Aerobik Ortam Koşullarının Etkisi	9
2.4 GIDALARDAKİ BİOJEN AMİNLER	10
2.4.1. Biojen Amin İçeren Gıdalar	10
2.4.2. Balık ve Balık Ürünleri	10
2.4.3. Et ve Et Ürünleri	11
2.4.4. Peynir	12
2.4.5. Şarap.....	13
2.4.5. Bira.....	14
2.4.6. Lahana Turşusu	14
2.4.7. Meyve ve Sebzeler	15
2.5. BİOJEN AMİNLERİN TOKSİSİTESİ	16
2.6. BİOJEN AMİNLERİN ANALİZ YÖNTEMLERİ	18
2.7. FARKLI PEYNİR TİPLERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
3. MALZEME VE YÖNTEM	23

3.1 KULLANILAN KİMYASALLAR	23
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler	23
3.2. YÖNTEM	24
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	24
3.2.2. Standartların Hazırlanması.....	24
3.2.2.1. Amin stok solüsyonları:.....	25
3.2.2.2. Standart çalışma solüsyonları.....	25
3.3. PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN BİOJEN AMİNLERİN EKSTRAKSİYONU	25
3.4. TÜREVLENDİRME	25
3.5. KROMATOĞRAFİK KOŞULLAR.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE TRİPTAMİN MİKTARLARI	30
4.2. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE 2-FENİLETİLAMİN MİKTARLARI.....	31
4.3. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE PUTRESİN MİKTARLARI.....	32
4.4. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE KADAVERİN MİKTARLARI	33
4.5. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE HİSTAMİN MİKTARLARI	34
4.6. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE TİRAMİN MİKTARLARI.....	35
4.7. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE SPERMİDİN MİKTARLARI	36
4.8. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE SPERMİN MİKTARLARI.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Biojen aminlerin oluşumu	5
Şekil 2.2: Biojen amin oluşumunun metabolik yolları	6
Şekil 4.1: Biojen aminlerin geliş zamanlarını gösteren örnek kromatogram.....	27
Şekil 4.2: Peynir örneklerinde triptamin miktarları (mg/kg)	30
Şekil 4.3: Peynir örneklerinde 2-feniletilamin miktarları (mg/kg)	31
Şekil 4.4: Peynir örneklerinde putresin miktarları (mg/kg).....	32
Şekil 4.5: Peynir örneklerindeki kadaverin miktarları (mg/kg)	33
Şekil 4.6: Peynir örneklerindeki histamin miktarları (mg/kg)	34
Şekil 4.7: Peynir örneklerindeki tiramin miktarları (mg/kg)	35
Şekil 4.8: Peynir örneklerindeki spermidin miktarları (mg/kg).....	36
Şekil 4.9: Peynir örneklerindeki spermin miktarları (mg/kg)	37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Biojen aminlerin sınıflandırılması	7
Tablo 3.1: Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan biojen amin miktarları	24
Tablo 4.1: Termofilik kültür kullanımı sonucunda peynirdeki biojen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi	28
Tablo 4.2: Mezofilik kültür kullanımı sonucunda peynirdeki biojen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi	28
Tablo 4.3: Klasik peynirdeki biojen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi	29

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

OLGUNLAŞMA ESNASINDA BEYAZ PEYNİRDE OLUŞAN BİOJEN AMİNLERİN ARAŞTIRILMASI

Derya GÜNEY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr. Süleyman TANYOLAÇ

II. Danışman : Yrd.Doç.Dr. Mehmet ALTUN

Bu çalışmada, beyaz peynir üretiminde kullanılan starter kültürler ve bu starter kültürlerin olgunlaşma süresinin bazı biojen aminlerin (triptamin, β -feniletilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin, spermin) oluşumuna etkileri incelenmiştir.

Termofilik ve mezofilik starter kültürü kullanılarak ve klasik olarak üretilmiş ve 8° C’de olgunlaştırılmış olan peynirlerden 8, 30, 60, 90, 120 ve 150. günlerde zamana bağlı olarak alınmış numunelerin biojen amin miktarları HPLC yardımıyla tayin edilmiştir. 150. günün sonunda toplam biojen amin içeriği mezofilik starter kültürü kullanılarak üretilmiş ve klasik olarak üretilmiş peynirlerde birbirine yakın değerler elde edilirken, termofilik starter kültürü kullanılarak üretilmiş peynirde diğer iki peynirin toplam biojen amin içeriklerinin hemen hemen yarısı kadar değerler elde edilmiştir.

Aralık 2009, 53 sayfa

Anahtar kelimeler: Biojen aminler, beyaz peynir

SUMMARY

M.Sc. THESIS

RESEARCH OF BIOGENIC AMINES THAT ARE PRODUCED AT THE MATURITY PROCESS OF WHITE CHEESE

Derya GÜNEY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof.Dr. Süleyman TANYOLAÇ

Co-Supervisor : Yrd.Doç.Dr. Mehmet ALTUN

In this study, starter cultures used in the production of white cheese and ripening period effects of these starter cultures in the formation of some biogenic amines (Tyriptamine, β - phenylethylamine, putrecine, cadaverin, histamine, tyramine, spermidine, spermine) were examined.

By using thermophilic and mesophilic starter cultures; on the 8, 30, 60, 90, 120 and 150. days, samples are taken depending on time and biojen amine amounts were determined with the help of HPLC from classically produced and being matured cheese at 8° C . At the end of the 150. day, a total content of biogenic amines were determined by using mesophilic starter culture and determined that classically produced cheeses obtain values close to each other, but the cheese which is produced with thermophilic starter culture obtained an almost half of biogenic amines values that two other cheeses have.

December 2009, 53 page

Keywords: Biogenic amines, white cheese

1. GİRİŞ

Türkiye’de üretilen sütlerin yaklaşık %20’si peynir yapımında kullanılmaktadır ve peynir çeşitleri arasında ekonomik değeri en yüksek olan beyaz peynirdir. Beyaz peynir, çeşit olarak özellikle Balkanlarda üretilen peynirler ile (Feta, Beli sir u kriskama, vb.) her ne kadar benzerlik gösterse de, olgunlaşma sıcaklıklarında farklılık olması nedeniyle bunlardan ayrılmaktadır. Beyaz peynir, yurdumuzda tüketimi en fazla olan peynir çeşididir. Bu peynir çeşidi üzerinde günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda daha çok standart kimyasal kriterlerin ve mikrobiyolojik özelliklerin incelendiği görülmektedir. Bu bileşenler; pH, nem, kül, tuz, asitlik, toplam protein, protein, çözünen protein, olgunlaşma indisi gibi kimyasal parametrelerin yanında, olgunlaşmada etkili olan starter kültürler ve mayaların türü gibi mikrobiyolojik parametrelerdir. Kimyasal parametreler, peynirin besin değeri, kabul edilebilirliği ve standartlara uygunluğu için etkili iken mikrobiyolojik parametreler hijyenik açıdan ve istenilen ürünün gelişmesini sağlamak açısından önemli bir etkiye sahiptir.

Bu çalışmada inek sütlerine mezofil ve termofil mikroorganizmalar ilave edilerek aynı şartlarda üretilmiş peynir örnekleri ile klasik olarak üretilmiş peynir örneği 8°C’de olgunlaştırılmış ve olgunlaşmanın 8., 30., 60., 90., 120. ve 150. günlerinde alınmış numunelerde biyogen amin içerikleri incelenmiştir.

Pastörize süttten üretilen peynirlerde istenilen tad, koku ve lezzeti oluşturabilmesi için farklı starter kültürler kullanılmaktadır. Mezofil kültürlerin yanı sıra termofil kültürlerin kullanılmasının amacı, bu kültürlerin ek aroma geliştirici etkilerinin gözlenmiş olmasıdır.

2.GENEL KISIMLAR

2.1. PEYNİR TANIMI VE ÖNEMİ

Peynir, sütün peynir mayası veya zararsız organik asitlerin etkisiyle pıhtılaştırılması, değişik şekillerde işlenmesi ve bu arada süzülmesi, şekillendirilmesi, tuzlanması bazen tat ve koku verme amacıyla zararsız maddeler katılması ve çeşitli süre ve derecelerde olgunlaştırılması sonucunda elde edilen besin değeri yüksek bir süt ürünüdür (Yetişmeyen, 1997).

Bugün dünyada 4000 çeşit peynir yapıldığı ve bunlardan bir kısmının ticari olarak fazla miktarda, bir kısmının da bölgesel olarak üretildiği belirtilmektedir (Polat,2001). Ülkemizde ise ekonomik açıdan önemli olan Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleri gibi endüstriyel boyutlarda üretilen ticari tip peynirlerin dışında Urfa peyniri, Civil peyniri, Otlu peynir ve Mihaliç peyniri gibi mahalli peynir çeşitleri de bulunmaktadır (Demirci ve diğ., 1994).

Peynir üretiminin büyük bir bölümü yeterli donanımdan yoksun olan küçük işletmelerde, starter kültür kullanılmaksızın çiğ sütlerden yapılmaktadır. Ancak her geçen gün bilinçli ve modern işletmelerin önderliğinde ürün standardizasyonunun önemi kavranmaktadır. Böylece peynir üretiminde pastörize süt kullanımı ve buna bağlı olarak da starter kültür kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir (Durlu Özkaya, 2001).

Çalışmamızda kullandığımız beyaz peynirin Türk Standartları Enstitüsü'nün TS 591/Ocak 1995 sayılı standardına göre, beyaz peynir, "Çiğ sütlerin (TS 1018, TS 11044, TS 11046 veya karışımlarının pastörize edilmesi veya pastörize sütlerin (TS 1019) imalat tekniğine göre işlenmesi, bu işleme sırasında gerektiğinde katkı maddelerinin ilavesi ve olgunlaştırılması sonucu elde edilen mamüldür" ifadesiyle tanımlanmaktadır. Kimyasal özellikleri incelendiğinde, TSE'ye göre titrasyon asitliği, laktik asit cinsinden kütlege en çok %3, pH değeri 4,5'un üzerinde, rutubet miktarı, peynirde kütlege en çok %60, tuz miktarı, katı maddede (peynir kurumaddesinde) kütlege en çok %10, ağır

metallerden bakır en çok 1 mg/kg, kalay 250 mg/kg, kurşun 0,3 mg/kg ve civa 0,03 mg/kg'dan fazla bulunmamalıdır. TSE tarafından tanımlanmış olan tip özelliklerine göre, katı maddede süt yağı oranı tam yağlı beyaz peynirde kütleye en az %45, yağlı beyaz peynirde kütleye en az %30, yarım yağlı beyaz peynirde kütleye en az %20, az yağlı (yavan) beyaz peynirde kütleye %20'den az olmalıdır.

Peynir olgunlaştırma, her peynir çeşidinin kendine has yapı, bileşim ve en önemlisi de duyu niteliklerini kazanabilmesi için belirli koşullar altında ve belli bir süre içerisinde geçirdiği bir üretim aşamasıdır. Olgunlaşmada rol oynayan en önemli etkenler; peynirin rutubet, tuz ve asitlik durumu, süttten gelen doğal enzimler, peynir mayası enzimi ve peynirin olgunlaşması sırasında mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimler gibi etkenler olarak gösterilir (Eralp, 1974; Uraz, 1981; Walstra ve diğ., 1993).

Starter kültür ilave edilen peynirlerde; laktoz, proteinler ve süt yağının starter enzimlerinin etkisi ile daha hızlı ve yüksek oranda parçalanması nedeniyle, peynirin olgunlaşma süresinde bir kısalma olmakta veya peynirde istenilen düzeyde olgunluğa daha hızlı erişilebilmektedir (Yaygın ve Kılıç, 1993).

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan bakterilerin temel işlevi, işlem parametrelerinin uygulanabilmesi için öngörülen sürede asit üretmektir. Asit üretiminin; pıhtı oluşumu, peynir suyunun ayrılması, yapı, tat ve koku oluşumunun başlatılması, patojenlere karşı ürünün korunması ve dayanımının artırılması üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Kültürlerin teknolojik yönden önemli bir diğer işlevi de proteolizdir (Üçüncü, 1999).

Peynirin olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteoliz sonucunda aminoasitler açığa çıkmaktadır. Bu aminoasitlerin yeterli miktarda olması ortamda bulunan mikroorganizma türü ve sayısına bağlı olarak toksik düzeyde biojen amin oluşumuna yol açmaktadır (Chang ve diğ., 1985; Joosten ve Van-Boekel, 1988).

Biojen aminler düşük molekül ağırlığına sahip, biyolojik olarak aktif organik bileşiklerdir. Aminoasitlerin bakteriyel enzimler ile dekarboksilasyonu sonucu

oluşmaktadır. Örneğin tiramin, histamin ve triptamin sırasıyla tirozin, histidin ve triptofan aminoasitlerinin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Özellikle bu aminler olgunlaşmış peynir ve fermente ürünlerde bulunmaktadır (Chang ve diğ., 1985).

Peynirlerde histamin, tiramin, putresin ve kadeverinin yüksek miktarda bulunması, o ürünün uygun koşullarda üretilmeyerek mikrobiyel kontaminasyona maruz kaldığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Edwards ve Sandine, 1981).

Escherichia, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türleri gibi pek çok bakterinin değişik düzeylerde biojen amin ürettiği bilinmektedir (Edwards ve Sandine, 1981; Joosten ve Stadhouders, 1987; Joosten ve Northolt, 1987; Joosten, 1988a; Sumner ve diğ., 1990; Joosten ve diğ., 1995; Durlu-Özkaya ve diğ., 1999; Marino ve diğ., 2000).

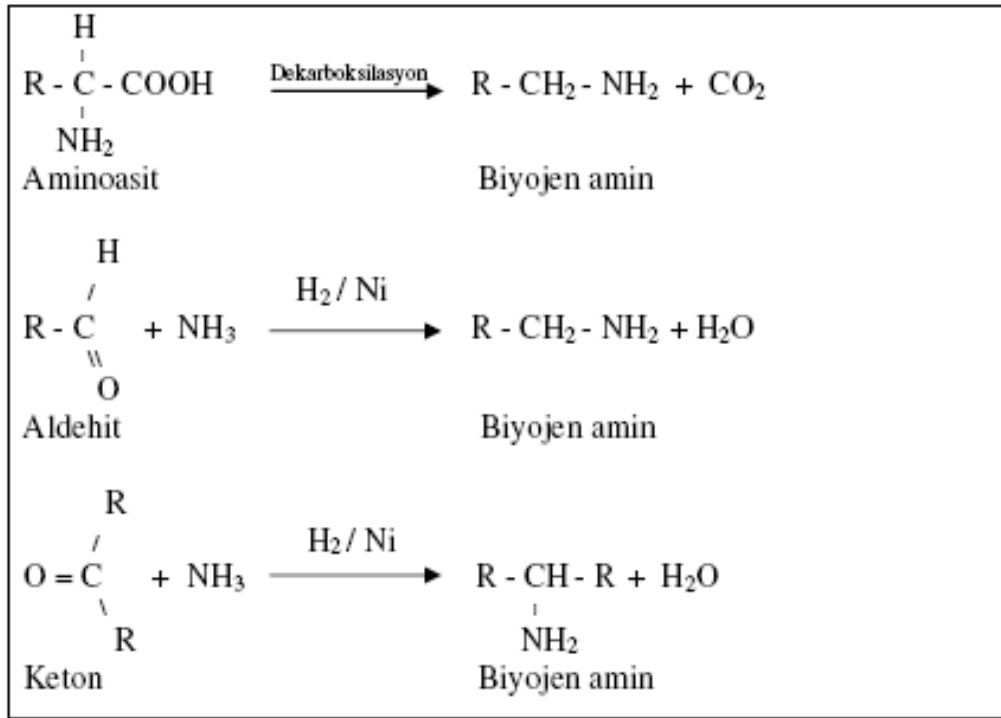
Biojen amin oluşumunda rol oynayan faktörlerin incelendiği pek çok araştırmada, genel olarak; peynirin içerdiği bakteri türü ve sayısının, mikroorganizmalar arasındaki etkileşiminin, proteoliz düzeyinin, peynir pH'sının, peynirdeki tuz konsantrasyonunun, peynirin olgunlaşma ve depolama sıcaklığının etken faktörler arasında olduğu ifade edilmektedir (Joosten, 1988a,b; Joosten ve Van-Boekel, 1988, Durlu-Özkaya ve diğ., 1999; Durlu-Özkaya ve Tunail, 2000; Durlu-Özkaya, 2001, Karahan ve diğ., 2001).

Proteolizden kısaca bahsedecek olursak; proteoliz bir çok peynir türünün olgunlaşması sırasında karşılaşılan en karmaşık ve en önemli biokimya olaylarından biridir. Proteolizin oluşma oranı çok sınırlı olanlardan (Mozzarella gibi) çok fazla olana kadar (örneğin mavi küflü türler) değişiklik gösterir ve ürünler arasında, bozulmamış bütün bir kazeinle karşılaştırılabilecek büyüklükteki polipeptidler, orta ve küçük peptidler ve serbest amino asitler bulunmaktadır. Proteoliz temelde olgunlaşmanın ilk kademeleri sırasında peynirin yüzeyinin yumuşamasından sorumlu olan olaydır ve sınırlı olmasına rağmen, doğrudan bir etki gösteren amino asitler ve peptidlerin oluşumu yoluyla peynir çeşnisinin gelişmesine etki etmektedir. Amino asitler bunun dışında pek çok çeşni unsurunun oluşmasında substrat olarak da davranmaktadır. Proteoliz peynirden alınan

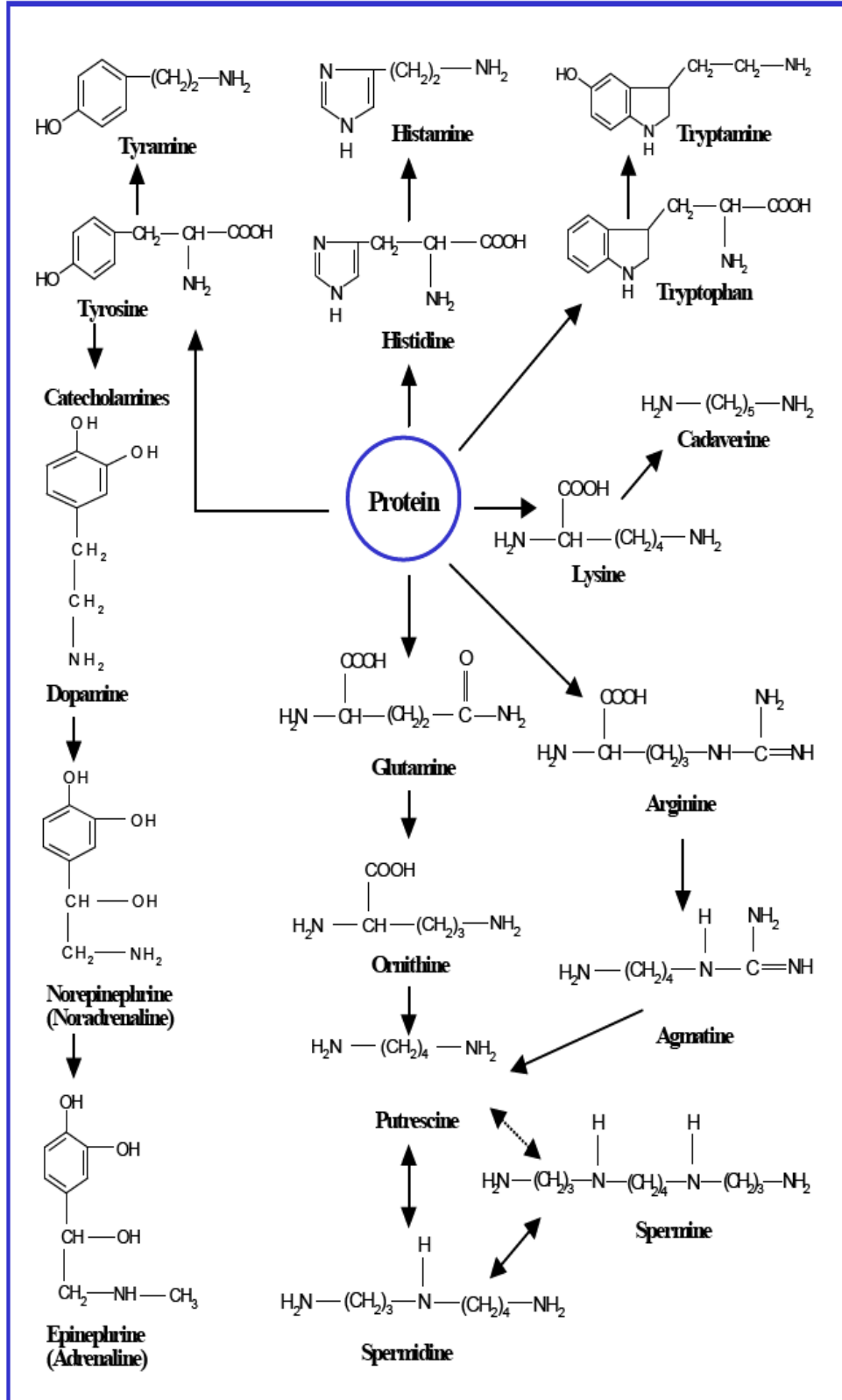
damak tadını ve çiğneme sırasında çeşni unsurlarının peynirden ayrılıp serbest hale geçmesine de etkide bulunmaktadır.

2.2 BİOJEN AMİNLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Biojen aminler temel olarak aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu sonucu oluşmaktadır (Silla ve Santos, 1996) . Şekil 2.1’de biojen amin oluşum tepkimeleri ve Şekil 2.2’de biojen amin oluşumunun metabolik yolları görülmektedir.



Şekil 2.1: Biojen aminlerin oluşumu.



Şekil 2.2: Biojen amin oluşumunun metabolik yolları (Özoğul, 2001).

Kimyasal olarak biojen aminler;

Alifatik : Putresin, kadaverin, spermin, spermidin

Aromatik : Tiramin, β -feniletilamin

Heterosiklik : Histamin, triptamin olarak sınıflandırılabilirler (Silla ve Santos, 1996; Çolak ve Aksu, 2002). Ayrıca içerdikleri amin grubu sayısına göre de monoaminler, diaminler, poliaminler olarak gruplandırılabilirler (Erkan, 2004).

Tablo 2.1: Biojen aminlerin sınıflandırılması.

Kimyasal Yapılarına göre	Alifatik Biojen Aminler	Aromatik Biojen Aminler	Heterosiklik Biojen Aminler
	Putresin	Tiramin	Histamin
	Kadaverin	β -feniletilamin	Triptamin
	Spermin		
	Spermidin		

İçerdikleri Azot Sayısına Göre	Monoaminler	Diaminler	Poliaminler
	Tiramin	Histamin	Spermin
	β -feniletilamin	Putresin Kadaverin	Spermidin

Biojen aminler hormonlar, alkaloidler, nükleik asitler ve proteinlerin sentezinde azot kaynağı olarak rol almaları, gıdalarda aroma maddelerinin oluşumuna katkıda bulunmalarının yanında insanlarda mide hacminin ve pH'nın düzenlenmesinde, vücut sıcaklığının ayarlanmasında ve beyin aktivitesinin yerine getirilmesinde son derece önemli rol oynarlar. (Ölmez, 2000 ; Allen, 2004).

Putresin, spermidin ve spermin gibi poliaminler, canlı hücrenin vazgeçilmez bileşenleridir. Hücre gelişimi ve metabolizmasında çok değişik fonksiyonları olan ve hızlı büyüyen dokularda yüksek oranlarda ihtiyaç duyulan bu maddelerin, metabolizmada hangi biyolojik olaylarda rol aldıkları henüz tam olarak

anlaşılamamıştır. Poliaminlerin, bağırsak fonksiyonlarının ve bağışıklık sisteminin fonksiyonları için gerekli olduğu bilinmektedir. Spermin ve spermidin bağırsak dokusunun gelişiminde rol oynarlar (Ölmez, 2000).

Katekolaminler, indolaminler ve histamin insanlarda önemli metabolik fonksiyonları yerine getirirler. Özellikle sinir sistemi fonksiyonlarında ve kan basıncı kontrolünde rol alırlar. Feniletilamin ve tiramin, kan basıncının yükselmesine neden olurken, histamin kan basıncını düşürür. Putresin, kadaverin ve agmatinin, insanlarda histamin oksidasyonunu engelleyerek histamin toksisitesini arttırdığı saptanmıştır. Histamin, triptamin, tiramin ve β -feniletilamin gibi biyolojik aktiviteye sahip aminlerin insan üzerinde önemli psikoaktif ve vasoaktif etkileri mevcuttur (Ölmez, 2000).

Biojen amin çalışmaları, sadece bileşiklerin toksikolojik olarak risk bulundurmaları açısından değil, gıda kalitesinin göstergesi olarak da ayrıca önem teşkil etmektedir. Biojen aminler, nitritler ile kolaylıkla reaksiyona girebilme ve kanserojenik nitrozamin oluşturabilme yeteneklerinden dolayı kanserojenik bileşikler olarak ele alınabilirler (Hotchkiss, 1989).

2.3 BİYOJEN AMİN OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Gıdalarda biojen aminlerin oluşumunda, amin üreten mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini etkileyen bazı faktörlerin sağlanması gereklidir. Bunlardan pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, başlatıcı kültürlerin varlığı en önemli faktörlerdir (Maijala,1993; Shalaby, 1996).

Mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini etkileyen bazı faktörlerin sağlanması gereklidir. Bunlardan pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve starter kültürlerin varlığı en önemli faktörlerdir (Çolak ve Aksu, 2002).

2.3.1 Sıcaklık ve pH'ın Etkisi

Dekarboksilaz aktivitesini ve dolayısıyla biojen amin oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden birisi pH'dır. Biojen amin oluşumunun, asidik ortamlarda bakteri için koruyucu bir mekanizma olduğu ifade edilmektedir (Maijala, 1993; Teodorovic, 1994).

Asidik ortamlarda aminoasit dekarboksilaz aktivitesi daha güçlü olmaktadır. Amin oluşumunda pH 4,0-5,5 arasındaki koşulların optimum olduğu bulunmuştur (Santos, 1996).

Sıcaklık bakterilerin amin üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Amin oluşumu için optimal sıcaklık değerleri, bakteri türlerine göre değişir (Mason, 1997). Biojen amin miktarlarının, depolama süresi ve sıcaklığı ile pozitif korelasyon içinde olduğu ifade edilmektedir (Santos, 1996).

2.3.2. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Biojen amin oluşumunda, ortamın tuz konsantrasyonu önemli bir faktördür. Tuz konsantrasyonunun %5'ten fazla olmasının histamin oluşumunu azalttığı ifade edilmiştir (Beutling, 1994). Tiramin üretiminin araştırıldığı bir çalışmada da %10 NaCl'ün tiramin oluşumunu engellediği bildirilmektedir (Aydın, 2006).

2.3.3. Starter Kültürlerin Etkisi

Amin üretmeyen starter kültürlerin kullanılması ile amin pozitif laktik asit bakterilerinin gelişimi büyük ölçüde engellenmektedir. Starterler, hammaddede mevcut bazı kontamine mikroorganizmaları ve böylece putresin ve kadaverin gibi bazı biojen aminlerin oluşumunu inhibe eder. Fakat histamin ve tiramin oluşumunu, amin üreten mikroorganizmalar çok düşük konsantrasyonlarda bulunsa bile inhibe etmez (Çolak ve Aksu, 2002).

2.3.4. Aerobik Ortam Koşullarının Etkisi

Aerobik ortam koşulları biojen amin sentezi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Genel olarak mikroorganizmaların biojen amin üretimi oksijenli ortamda artmaktadır. *Enterobacter cloacae* ile yapılan bir çalışmada, hücrelerin aerobik koşullarda, anaerobik koşullara göre iki kata daha fazla putresin ürettiği belirtilmiştir (Ölmez, 2000). Ayrıca ortamda %0,5-2 oranında glikoz varlığının amin üretimini olumlu yönde hızlandırdığı bildirilmektedir (Turantaş ve Öksüz, 1998).

2.4. GIDALARDAKİ BİOJEN AMİNLER

2.4.1. Biojen Amin İçeren Gıdalar

Biojen aminler; balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, süt ürünleri, sarap, bira, sebzeler, meyveler ve çikolata olmak üzere geniş bir gıda grubunda bulunmaktadır.

2.4.2. Balık ve Balık Ürünleri

Balık; nötral pH, yüksek su aktivitesi ve yüksek miktarda serbest aminoasit içermesiyle karakterize edilmektedir. Bu nedenle mikrobiyal bozulmalara oldukça açıktır. Mikroorganizmalar serbest aminoasitleri, karşılık gelen biojen aminlere dekarboksile edebilmektedirler (Leuschner ve Hammes, 1999). Biojen aminler balıkların bozulmasının tespiti için bir kalite kriteri olarak kabul edilmektedirler (Hwang ve diğ.,1997).

Biojen aminler balık zehirlenmelerine neden olabilmektedirler. Balık kası (özellikle koyu renkli olanlar) oldukça yüksek oranda tirozin ve histidin içermektedirler. Et rengi koyu olan balıklarda beyaz etli balıklara oranla daha fazla histidin mevcuttur (Erkan, 2004). Bu histidin ilgili mikroorganizmalar tarafından histamine dönüştürülebilmektedir (Halaszet ve diğ., 1994). Bu nedenle balık ve balık ürünleri histamin zehirlenmesinden sorumlu tutulan başlıca gıda grubu olarak değerlendirilmektedir (Çolak ve Aksu, 2002). Histamin zehirlenmesinin belirtileri, Scomberesocidae ve Scombridae (ton ve uskumru) familyasına ait balıkların tüketimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle histamin zehirlenmesi Scombroid zehirlenmesi olarak da adlandırılmaktadır (Leuschner ve Hammes, 1999).

Histamin biyolojik olarak aktif bir amin olup, insan vücudu içerisinde birçok tepkimelere yol açabilmektedir. Histamin kalp damar sistemi ve çeşitli iç salgı bezlerindeki hücre membran reseptörlerine bağlanarak etkisini göstermektedir. Deriyi etkileyen karakteristik belirtiler kızarıklık, ödem ve iltihap oluşturmasıdır. En yaygın görülen belirtiler; mide bağırsak bölgesi belirtileri (ishal, mide bulantısı, kusma), deride görülen belirtiler (kızarıklık, ödem), gerginlik ve sinirsel belirtiler (kasıntı, kızarıklık, çınlama, baş ağrısı) olmaktadır. "Histamin balık zehirlenmesi" sonucu oluşan belirtiler toksik miktarların emiliminden birkaç dakika veya saat sonra görülebilmektedir. Tipik

olarak hastalık birkaç saat sürmekte ancak bu süre birkaç güne uzayabilmektedir (Özogul ve diğ., 2004).

Balıkların fermentasyonu biojen amin oluşumu için gerekli koşulları sağlamaktadır. Serbest aminoasitlerin ve dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların varlığı, bakteriyel gelişme ve dekarboksilaz sentezine olanak sağlayan ortam koşulları biojen aminlerin oluşumuna neden olmaktadır (Petaja ve diğ., 2000).

2.4.3. Et ve Et Ürünleri

Dondurma işlemi gibi et ürünlerine uygulanan muhafaza işlemleri, çözündürme, etin işlenmesi ve et ürünlerinde bulunan bakteriler; söz konusu ürünlerde biojen amin oluşumunu etkileyen başlıca faktörlerdir (Durlu-Özkaya ve diğ., 2001).

Biojen amin konsantrasyonu fermente et ürünlerinde, taze ve pişirilmiş et ürünlerine oranla daha fazla farklılık göstermektedir. Çünkü fermentasyon işlemi biojen amin oluşumunu etkileyen pek çok değişik faktör içermektedir. Bu faktörler; hammaddenin çeşit ve kontaminasyon derecesi (yapısal bozulmayı tetikler), üretim koşulları, proses basamakları, starter kültürler olarak sıralanabilmektedir (Ruiz-Capillas ve Jimenez-Calmenero, 2004).

Et ürünlerinde biojen aminler üzerine çalışmalar bulunmasına rağmen bu çalışmaların çoğunluğu fermente ürünler üzerinde yapılmış olup taze et ve kaynatılmış gıdalar üzerinde yapılan çalışmalar daha azdır (Ruiz-Capillas ve Jimenez-Calmenero, 2004).

Yapılan bir çalışmada pişirilmiş ve pişirilmemiş sığır etlerinin 4-10°C'de depolanması durumunda biojen amin içeriklerindeki değişme incelenmiştir. Putresin, 1,3-diaminopropan, spermin, spermidin, kadaverin ve tiraminin depolama sıcaklığı ve depolama süresi ile pozitif bir korelasyon gösterirken histamin düzeyinin depolama koşullarından etkilenmediği görülmüştür. Spermin ve spermidin dışındaki biojen aminlerin konsantrasyonunun pişirme işleminden etkilenmediği ancak spermin ve spermidin düzeyinin ısı muamelesi sonucu azalma gösterdiği aynı çalışmada ortaya konmuştur (Halasz ve diğ., 1994).

Yapılan bir çalışmada $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 36 gün süreyle depolanan kırmızı ve beyaz etteki biojen amin içeriğine depolama süresinin etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada biojen amin içeriğinin beyaz ette, kırmızı ete oranla daha erken arttığı gözlenirken, bu sonuç tavuk etini oluşturan kas dokunun proteolitik enzimler tarafından kolayca parçalanabilen daha kısa liflerden oluşmasına bağlanmıştır. İki et grubunda da kadaverin en yüksek düzeyde üretilmiştir; bu da kadaverinin öncü aminoasidi olan lisinin ette fazla olmasının bir sonucudur. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak iki et türünde de kadaverin miktarındaki büyük artış ve kırmızı etteki tiramin miktarındaki artış etin bozulmasının bir indikatörü olarak gösterilebilir (Vinci ve Antonelli, 2002).

Fermente sucuklarla ilgili yapılan birçok çalışmada, bu üründe biojen aminlerin önemli miktarlarda bulunabildiği bildirilmiştir. Sucuklarda oluşan en önemli biojen aminler, putresin, histamin, kadaverin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, spermidin ve spermindir (Çolak ve Aksu, 2002).

Yapılan bir çalışmada Türk sucuklarında starter kültürlerin biojen amin oluşumuna etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda starter kullanılmadan üretilen sucuklarda putresin ve tiramin miktarlarının depolama ile artış gösterdiği ancak starter eklenerek üretilen sucuklarda putresin oluşumunun durduğu, tiramin düzeyinde ise bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Farklı starter kültürlerin ve/veya proses rejimlerinin biojen amin oluşumunu kontrol edebileceği ifade edilmiştir (Ayhan ve diğ., 1999).

2.4.4. Peynir

Peynir yüksek amin içeriğine sahip olan gıdalardan biridir (Halaszet ve diğ., 1994) . Peynirde bulunabilen en önemli biojen aminler; tiramin, histamin, putresin, kadaverin, triptamin ve β -feniletilamin'dir (Shalaby, 1996).

Peynir, diğer fermente gıdalar gibi amin oluşumu için ideal bir gıda ürünüdür. Peynir üretim prosesi sadece serbest aminoasit oluşumunu sağlamasının yanında dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların varlığı ile onların gelişimine ve dekarboksilaz enzim aktivitesine olanak sağlamaktadır (Novella-Rodriguez ve diğ., 2000).

Kazein proteolizi peynirin olgunlaşması sırasında yer alan en önemli aşamadır. Bu aşama sırasında kazein, peynirde bulunan proteaz ve peptidazlar tarafından yıkıma uğramakta ve sonuçta aminlerin öncü maddeleri olan serbest aminoasitler oluşmaktadır. Olgunlaştırma süresi arttıkça serbest aminoasit içeriğinin artması dolayısıyla biojen amin oluşma olasılığı da artmaktadır (Ordenez ve diğ., 1997).

2.4.5. Şarap

Histamin, tiramin ve putresin şaraplarda bulunabilen başlıca biojen aminlerdir. Metilamin, etilamin, β -fenilettilamin, izopentilamin ve kadaverin gibi diğer biojen aminler üzüm suyunda bulunmakta ve şarap üretim prosesi sırasında miktarlarında değişiklikler meydana gelmektedir (Lonvaud- Funel, 2001).

Şarap yapım prosesi sırasında birçok amin oluşumu ve birikimi olabilmektedir. Genel olarak kırmızı şaraplar beyaz şaraplardan daha fazla miktarda amin içermektedirler (Gloria ve diğ., 1998). Hemen hemen bütün kırmızı şaraplarda ve beyaz şarapların çoğunda malolaktik fermentasyona ihtiyaç duyulmaktadır (Lonvaud-Funel, 2001). Malolaktik fermentasyon şaraplarda malolaktik bakteriler tarafından yürütülen ikincil şarap fermentasyonu olarak ifade edilen bir işlemdir. İyi kalite şarapların olumlu özellikleri deasidifikasyon, bakteriyolojik kararlılık, arttırılmış tad ve kompleks bir aromaya sahip olmalarıdır (Yurdağül ve Bozoğlu, 2001). Malik asidin dekarboksilasyonu ile sağlanan deasidifikasyon ve bakterilerin sekonder metabolizmaları sonucu oluşan kompleksleşmiş duyusal kalite malolaktik fermentasyonun önemli bir sonucudur (Lonvaud-Funel, 2001).

Şaraplarda malolaktik fermentasyonda rol oynayan bakteriler, aminoasitlerin dekarboksilasyonu için gerekli olan enzimlere sahiptirler (Lonvaud-Funel, 2001).

Malolaktik fermentasyonun histamin düzeyine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada histamin miktarında malolaktik fermentasyon sırasında çok büyük bir artış olduğu belirlenmiştir (Lehtonen, 1996).

2.4.5. Bira

Birada bulunan biojen aminlerin çeşitleri ve miktarları, hammaddeden, bira yapım tekniklerinden ve bira üretimi sırasında gerçekleşebilen mikrobiyal kontaminasyondan etkilenebilmektedir. Putresin, agmatin, spermidin gibi bazı aminler hammaddenin yapı unsurlarıdır. Malta genellikle yüksek düzeyde putresin, agmatin, spermin, spermidin ve düşük düzeyde histamin, β -feniletilamin, triptamin ve kadaverin tespit edilmektedir. Arpada ise tiramin, putresin, spermin, spermidin ve agmatin tespit edilmiştir. Serbetçi otunda da yüksek oranda tiramin, β -feniletilamin, putresin, spermin, spermidin ve agmatin tespit edilmiştir. Ancak serbetçi otunun bira üretimi sırasında kullanılan miktarı oldukça az olduğu için birada bulunan biojen amin miktarına etkisi önemsizdir. Pirinç gibi bazı tahılların kullanımının bira ve biradaki biojen amin miktarını azaltmakta faydalı olacağı belirtilmiştir (Gloria ve Izquierdo-Pulido, 1999).

Malta histidin dekarboksilaz aktivitesi bulunmadığından birada histamin bulunması her zaman mikrobiyal kontaminasyonun bir sunucudur (Halasz ve diğ., 1994).

HPLC kullanılarak 16 bira örneğinde 8 biojen aminin (histamin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, putresin, kadaverin, spermin, spermidin) incelendiği bir çalışmada 6 amin tayin edilebilecek düzeylerde bulunurken histamin ve spermin tespit edilmemiştir. Belirlenen biojen amin miktarları 0,1-17,2 ppm arasında değişiklik gösterirken en fazla düzeyde tiramin ve putresin bulunmuştur. Alkol içermeyen biralara ve alkollü bira örnekleri arasında biojen amin miktarı yönünden önemli bir fark görülmemiştir (Denli ve Anlı, 1998).

2.4.6. Lahana Turşusu

Lahana turşusunun Avrupa ülkelerinde üretilen şekli sauerkraut adı verilen Alman tipi susuz lahana turşusudur. Sauerkraut hazırlanmasında salamuralı fermentasyon uygulanmamakta, kuru tuz kullanılarak hücre öz suyu dışarı çıkarılmaktadır (Özdestan, 2004).

Sauerkraut üretiminde doğal fermentasyon meydana gelmektedir. Fermentasyon esnasında aerob mikroorganizmalar daha sonra fakültatif anaerob mikroorganizmalar aktivite kazanır. Bunları laktik asit bakterilerinin aktivitesi izlemektedir. Mikrofloradaki

bu geniş varyasyon nedeniyle biojen amin miktarında değişmeler olmaktadır (Özdehan, 2004).

Lahana turşusu üretiminde genellikle starter kültür ilavesi olmamaktadır. Laktik asit bakterilerinin pek çoğu fermentasyonun farklı aşamalarında gelişmektedir (Özdehan, 2004).

2.4.7. Meyve ve Sebzeler

Aminler bitkilerin yapısında doğal olarak mevcut olduklarından meyve ve sebzelerde geniş bir dağılım göstermektedir. Meyve ve sebzelerin amin içerikleri olgunluk dereceleri göre değişiklik göstermektedir (Erkan, 2004). Meyve ve sebzelerde bulunan serbest biojen aminler gıdaların tipik ve karakteristik olgunluk tadının oluşmasında rol oynamaktadırlar. Serbest biojen aminler belirli aroma maddelerinin öncü maddeleridir. Diğer taraftan biojen aminlerin sebzelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunması uzun depolanma süresinin sonucu ortaya çıkan bozulmayla ilgilidir (Moret ve diğ., 2005). Bitkisel kaynaklı gıdalarda genellikle arginin bulunur, arginin dekarboksilasyonu sonucu agmatin, agmatinden de putresin oluşur (Erkan, 2004).

Sebzeler üzerinde yapılan mikrobiyal çalışmalar, sebzelerde baskın mikroorganizma grubunun bakteriler olduğunu göstermiştir. Düşük oranda küf ve mayaların bulunduğu da ifade edilmiştir. Meyvelerin pH değerleri sebzelere oranla daha düşük olduğundan asit tolere edebilen küf ve mayalar ile laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmaların gelişimi dahi sınırlandırılabilir. Diğer taraftan taze ve bütün sebze ve meyveler kabukları sayesinde mikrobiyal saldırılardan korunmaktadırlar. Kesilmiş ve doğranmış ürünler kabuklu ürünlere göre mikrobiyal bozulmalara karşı daha dayanıksızdırlar (Halasz ve diğ., 1994).

Portakal, ahududu, limon, greylfurt, mandalina, çilek ve üzümde elde edilen meyve suyu ve nektarları değişik miktarlarda çeşitli biojen aminler içermektedirler. Bunların en başında ise putresin gelmektedir. Ayrıca kakao tanelerinde ve kakaodan yapılan çikolata, çikolata ürünleri ve şekerlemelerde β -feniletilamin bulunabilmektedir (Silla-Santos, 1996).

2.5. BIOJEN AMİNLERİN TOKSİSİTESİ

Biojen aminler fazla miktarda alındıklarında vücutta toksik etkilere yol açarlar ve bu bağlamda ya psikoaktif (sinir sistemi üzerinde etkili) ya da vazoaktif (damarlar üzerinde etkili) reaksiyonlara neden olurlar. Özellikle tiramin ve histamin gibi toksit metabolitler vasküler sistemde ve sinir sisteminde doğrudan yahut dolaylı etki gösterebilirler. En önemli gıda intoksikasyonlarından (zehirlenme) biri histamin zehirlenmesidir. Putresin ve kadaverin gibi ikincil aminler nitritle birleşerek heterosiklik karsinojenik nitrozaminler, nitrozaprolidin ve nitrozapiperidin oluşturabilirler (Üçüncü, 2004).

Aminlerin toksik dozlarını kesin belirlemek son derece güçtür. Çünkü toksik doz, bireyin bunları mono- ve diaminoksidaz enzimleri ile aldehitlere dönüştürerek detoksifiye (zehirsizleştirme) etme verimliliğine ve ortamda diğer aminlerin varlığına bağlı olarak değişir. Histamin için yasal üst sınırı 1 kg gıdada 100 mg veya 1 litre içkide 2 mg' dır. Tiramin için bu değer, 100-800 mg/kg ; feniletilamin için ise 30 mg/kg' dır. Belirtilen düzeylerde aminin vücuda alınmasının, eğer ortamda aminoksidaz enzim inhibitörleri (engelleyicileri) mevcut değilse, risk oluşturma olasılığı düşüktür. Normal koşullarda diyetle alınan aminler gıdadan absorbe edilip aminoksidaz enzimlerinin etkisiyle ya da konjügasyonla vücutta hızla detoksifiye edilir. Ancak hassas bireylerde veya bu enzimleri inhibe eden maddelerin varlığında detoksifikasyon işlemleri gerçekleşmez ve aminler vücutta birikir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda: 3 mg feniletilaminin migrene neden olduğu, 6 mg tiraminin ise monoaminoksidaz enzimi ile beraber alınması durumunda sağlık açısından tehlikeli doz düzeyine ulaştığı belirlenmiştir (Üçüncü, 2004).

Tiramin ve histamin, insanlar üzerindeki önemli fizyolojik etkileri nedeniyle en çok ilgi çeken biojen aminlerdir. İlk kez 1846 yılında Liebig tarafından izole edilen tiramin , tirozin aminoasidinin enzimatik dekarboksilasyonu sonucunda oluşan ve kan basıncını yükselten vazoaktif bir amindir. Ayrıca, solunumu artırır ve çarpıntıya yol açar, kan şekerini yükseltir, şiddetli baş ağrısına neden olur; migren ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Üçüncü, 2004).

Gıdalardaki tiraminin aşırı duyarlı bireylerde diyet kaynaklı migren ataklarının sorumlusu olduğu ileri sürülmektedir. Nitekim, migren hastalarında tiramini metabolize eden enzimlerin aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiş, dolayısıyla tiramin ile migren arasında bir ilişki kurulmuştur. (Üçüncü, 2004).

Ayrıca, tiramin ile nitrit etkileşiminden açığa çıkan “3-diazotiramin” adlı bileşiğin farelerde kansere neden olduğu belirlendiğinden, tiraminin mutejenik bir önmadde olduğu düşünülmektedir. (Üçüncü,2004). Tiramince zengin gıdaların çarpıntı ve solunum güçlüğüne yol açtığı ve ayrıca histaminin toksik etkilerini arttırdığı da vurgulanmaktadır. (Üçüncü, 2004).

Tiramin saf halde ve diğer biojen aminlerden ayrı alındığında toksik etkileri 400 mg’ın üzerindeki dozlarda gözlenmektedir. Fakat önceden de belirtildiği gibi monoaminoksidaz inhibitörleri kullanan hastalarda 6 mg gibi düşük bir doz bile hipertansiyon krizlerine neden olabilmektedir (Üçüncü, 2004).

Histaminden ayrıca bahsedecek olursak; etkisi en yüksek amindir. Histidin dekarboksilasyonu ile oluşan bu biojen amin aslında vücutta birçok önemli işlevlere sahip bir bileşendir. Ana görevi, vücutta humoral sistem adı verilen ve bakteri hastalıklarının çoğuna karşı bağışıklık kazanılmasını sağlayan sistemde aracı rolü oynamasıdır; aynı zamanda beyinde nörotransmittör olarak da görev yapabilir (Üçüncü, 2004).

Histaminin kandaki konsantrasyonu etkin bir şekilde regüle edilir. Fakat histamini denetleyen mekanizma , alınan histaminin tamamını regüle etmede yetersiz kalırsa veya diğer toksik maddelerle histamin metabolizması bozulmuş ise ; histamin zehirlenmesi ortaya çıkabileceği gibi, fazla miktarda histamin içeren gıdaların tüketimi sonucunda da bu tip zehirlenmeler olabilir. Putresin ve kadevin gibi diğer aminlerin varlığı histamin zehirlenmesinin etkinliğini daha da arttırıcı rol oynar. Çünkü bu aminler, histamini metabolize eden diaminoksidaz ve histamin-N-metiltransferaz enzimlerini inhibe eder. Dolayısıyla histamin toksisitesi üzerinde sinerjistik etkiye sahiptirler. (Üçüncü, 2004).

Histamin zehirlenmesinde, önce yüzde ve boyun derisinde ürtiker olarak adlandırılan yangı (kırmızılık, şişkinlik, ısı ve ağrı olması) ve tümünden anafilartik şok olarak söz edilen bir dizi olay açığa çıkar; bunu genellikle şiddetli baş ağrıları izler; kalp çarpıntısı, baygınlık, hızlı veya yavaş nabız atışı, mide-bağırsak şikayetleri, bronş spazmları ve solunum sıkıntısı gibi semptomlar da rapor edilmiştir (Üçüncü, 2004).

2.6. BİOJEN AMİNLERİN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Histamin ve diğer biojen aminlerin nitel ve nicel tayinleri için kromatografi, florimetri, kapiler elektroforez v.b. teknikler kullanılmaktadır. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler en kullanışlı yöntemlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC) biojen amin analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılan kromatografik yöntemlerdir (Shakila ve diğ., 2001). Bunlar içinde HPLC en çok kullanılan yöntemdir (Özdekan ve Üren, 2006).

Genelde gıdaların matriksi kompleks olduğundan kromatografik analizden önce ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin uygulanması gerekmektedir. Biojen aminlerin ve biojen amin tuzlarının polarlıklarının birbirinden az veya çok farklı olması, dikkate alınmadığı takdirde, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sırasında biojen amin kayıplarına neden olur. Katı matriksten biojen aminlerin ekstraksiyonu su ile oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklıklarda yapılabilir. Bağlı biojen aminlerin ekstraksiyonu asitlerle gerçekleştirilebilir. Biojen aminlerin ekstraksiyonu için genel olarak perklorik asit, trikloroasetik asit (TCA) veya hidroklorik asit kullanılabilir. Bazı araştırmacılar tarafından katı matriksten biojen aminlerin ekstrakte edilmesinde metanol, aseton, asetonitril-HClO₄ ve diklorometan-HClO₄ gibi kısmen polar olan organik solventler kullanılmıştır. Şarap, bira ve turşu salamurası gibi kompleks olmayan örneklerle çalışılırken ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerine gerek duyulmamaktadır. Süzme, santrifüjleme v.b. basit işlemlerden sonra, veya girişim yapan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra hemen türevlendirme yapılabilir. Kompleks gıdalardan biojen aminlerin ekstraksiyonu sonucu elde edilen çözeltinin saflaştırılarak girişim yapan maddelerden arındırılması gerekir. Bu amaçla sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), C18 kartuşu kullanılarak katı-faz ekstraksiyonu (SPE) veya alumina veya iyon değiştirici içeren kolon kromatografisi kullanılabilir (Busto ve diğ., 1994). Sıvı-sıvı

ekstraksiyonunda, genellikle HCl veya TCA içeren ekstraktın saflaştırılması için, bu sulu ekstrakt uygun bir tuz (örneğin NaCl) ile doyurulur, pH'ı bazik yapılır ve organik bir solventle muamele edilerek biojen aminlerin organik faza geçmesi sağlanır. Tüm biojen aminlerin kantitatif bir şekilde sulu fazdan organik faza geçmesi için değişik organik çözücüler denenmiştir. Hegzan, dietileter, n-bütanol, kloroform gibi organik çözücülerin veya bunların karışımlarının kullanıldığı metotlarda bildirilmiştir (El-Sayed, 1996).

2.7. FARKLI PEYNİR TİPLERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yapılan çalışmalar sonucunda peynirde rastlanan başlıca biojen aminlerin histamin, tiramin, putresin ve kadaverin olduğu görülmüştür (Joosten ve Van Boekel, 1988; Diaz-Cinco ve diğ., 1992; Tawfik ve diğ., 1992; Vale ve Gloria, 1998; Kebary ve diğ., 1999; Valsamaki ve diğ., 2000).

ABD'de 1980'de Swiss peyniri ile hazırlanan salatadan kaynaklanan gıda zehirlenmesi meydana gelmiştir. Salata bileşenlerinin incelenmesi sonucunda patojenik bakteri ya da stafilokok enterotoksine rastlanmamıştır. Ancak HPLC ile Swiss peynirinde gerçekleştirilen analizler neticesinde 187 mg/100g düzeyinde histamin saptanmıştır. Bu miktar gıda zehirlenmeleri için yeterli olduğundan intoksilasyonun histaminden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Taylor ve diğ., 1982).

Çoğunluğu Edam (n=26) ve Emmental (n=22) peynirlerinden oluşan toplam 76 peynir örneğinde amin içeriği HPLC tekniği kullanılarak belirlenmiştir. En yüksek amin miktarı Emmental peynirlerinde bulunmuştur. 3 ve 6 ay depolanan tüm Emmental peyniri örneklerinin %86'sındaki histamin miktarı <20 mg/100g olarak belirlenmiştir. 3 ay depolanan peynirlerin %91'inde <10mg histamin/100g bulunmuştur. Blok Emmental peynirlerinin %79'unun <20mg tiramin/100g içerdiği belirlenmiştir. Edam peynirinin amin içeriği ise oldukça az bulunmuştur. Tüm örneklerde histamin içeriği <3,5 mg/100g ve tiramin içeriği tek bir örnek dışında (9 mg/100g) <4,0 mg/100g düzeyindedir. En yüksek amin içeriğine sahip peynirler olarak Kappeli ve Polar peyniri belirlenmiştir. Peynirin kalitesi ve amin içeriği arasında açık bir ilişki kurulamamıştır. Amin içeriği bazen A kalite peynirlerde bile yüksek çıkmıştır (Antila ve diğ., 1984).

Histidini dekarboksile eden *Lactobacillus* St2A suşu kullanılarak üretilen Gouda peynirinin depolanması sırasında suşun sayısal değişimi, dekarboksilaz aktivitesi, histidin ve histamin konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca pH, sıcaklık, substrat ve ürün konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkileri de incelenmiştir. Bir aylık depolama sonunda bakteri 10^8 kob/g'ın üzerinde bir konsantrasyonla maksimum düzeye ulaşmıştır. Enzim aktivitesi yaklaşık 40 gün olgunlaşmadan sonra en yüksek değerine ulaşmış ve sonra kademeli olarak azalmıştır. Histamin miktarı olgunlaşma sırasında kademeli olarak artmıştır. Peynir kalıplarının ortasındaki histamin konsantrasyonu (5,8 mmol/kg) kalıp kenarlarına (3,8 mmol/kg) göre daha yüksek bulunmuştur (Joosten ve Van Boekel, 1988).

Yedi (7) farklı çeşitten toplam 31 adet peynir örneğinin incelendiği bir diğer çalışmada Mish peynirinin en yüksek düzeyde biojen amin (95,08 mg/100g) içerdiği belirlenmiştir. Mish peynirini Roquefort (44,1 mg/100g) ve Ras (27,46 mg/100g) peynirleri takip etmiştir. Yumuşak beyaz peynirler grubundan olan Domiati, Tallaga ve Karish peynirlerinde ise çok düşük düzeylerde biojen amin belirlenmiştir. Mish peynirinde toplam aminlerin % 25,9'unu histamin oluşturmuştur (Mehenna ve diğ., 1989).

Feta peynirinin olgunlaşması sırasında 4 aylık bir zaman aralığında biojen amin oluşumu ve bu oluşumun aminoasitlerle ilişkisi araştırılmıştır. Olgunlaşmış peynirde 60 gün sonunda biojen amin miktarı 330 mg/kg, 120 gün depolamadan sonra ise 617 mg/kg olarak saptanmıştır. Olgunlaşma sırasında tiramin ve putresin başlıca biojen aminler (60 ve 120 günde % 69,7 ve % 71,2) olmasına karşılık, triptamin ve 2-feniletilamin konsantrasyonları çok düşük bulunmuştur. Toplam amin miktarı olgunlaşmanın 120. gününde yaklaşık 620 mg/kg'a ulaşmıştır. Amin üretimi 1-15 ve 60-120 günler arasında gerçekleşmiştir. Biojen amin düzeyinin nispeten düşük olmasından Feta peynirinde düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarının aminoasit dekarboksilasyonu için uygun şartları oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Valsamaki ve diğ., 2000).

Histamin zehirlenmelerinin taşıdığı önem sebebiyle 44 farklı İspanyol peynirinde histamin ve tiramin oluşturan mikroorganizmalar incelenmiştir. 694 adet izolat elde edilmiş, histidin ve tirozin dekarboksilaz aktivitesi yönünden test edilmiştir. Seçici kültür ortamından izole edilen enterobakterler ve küfler dışındaki mikroorganizmaların tiramin oluşturma aktivitesine sahip bulunmuştur. Tiramin oluşturan tanımlanmış izolatlar çoğunlukla Gram pozitif bakteriler olarak saptanırken, histamin bazı laktik asit bakterilerinin yanı sıra enterobakterler tarafından oluşturulmuştur. Tiramin oluşturan laktik asit bakterisi suşlarının çoğu yüksek miktarda tiramin içeren peynirlerden izole edilmiştir. Bu peynirlerden bazılarında yüksek düzeyde enterokok saptanmıştır. Ancak histamin oluşturan laktik asit bakterileri 100 mg/kg'dan daha az histamin bulunan örneklerden izole edilmiştir. Örneklerdeki tiramin miktarı histamin miktarından önemli miktarda fazla bulunmuştur. Cabrales peyniri örneğinde (küfle olgunlaştırılan peynir) histamin (928 mg/kg) ve tiramin (1807 mg/kg) konsantrasyonlarının en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Roig-Sagués ve diğ., 2002).

Ayrıca geleneksel peynir çeşitlerimizin biojen amin düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır.

Ankara süpermarketlerinden toplanan 20 adet Tulum peyniri örneğinde kolon öncesi türevlendirme yapılarak, HPLC ile biojen amin içeriği saptanmıştır. Örnekler triptamin, 2-feniletilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin ve spermin içerikleri açısından incelenmiştir. Örneklerde laktik asit bakterileri, koliform grubu bakteri, toplam mezofil aerob bakteri, maya ve küf sayımları yapılmıştır. Tulum peynirinde en fazla bulunan biojen aminlerden 2-feniletilamin 64 ± 3 , $34-331\pm 19,1$ mg/100g arasında değişim gösterirken, putresin $17,2\pm 3$, $23-86,7\pm 7,01$ mg/100g arasında değişmiştir. Mikrobiyal değişimler 3 ay boyunca 5°C ve 20°C 'de yapılan depolamadan sonra belirlenmiştir. Aminler başlangıçta düşük konsantrasyonlardayken depolamadan sonra bakterilerin gerçekleştirdiği proteoliz sonucu miktarları artmıştır. Örneklerden bazılarında 5°C ve 20°C 'de depolamadan sonra en yüksek konsantrasyonda belirlenen biojen amin tiramin olmuştur. Tiramin $17,3\pm 1,28$ mg/100g ve $44,9\pm 3,21$ mg/100g arasında değişen değerler göstermiştir. Bulunan bu değerler toksik olmasa da peynir örneklerine mikrobiyal bulaşma olduğunu göstermesi bakımından oldukça önemlidir (Durlu-Özkaya ve diğ., 1999).

Bir başka çalışmada, starter kültür kullanılarak ve kullanılmadan üretilmiş Beyaz peynirlerin tiramin içeriklerinin 0,78 - 25,9 mg/100g arasında değiştiği belirlenmiştir. Başka bir araştırmada Eski Kaşar, Taze Kaşar, Mihaliç, Otlu, Örgü, Urfa ve Civil peyniri gibi farklı grup peynirler arasından biojen amin içeriği en yüksek peynir grubunun Civil peyniri olduğu (toplam 349,31 mg/100g), bunu sırasıyla Urfa peyniri (65,19 mg/100g), Mihaliç peyniri (60,89 mg/100g), eski Kaşar (58,49 mg/100g), Otlu peynir (34,78 mg/100g), taze Kaşar (20,14 mg/100g), ve Örgü peynirinin takip ettiği belirlenmiş, Civil peynirinde tiramin miktarı (138,16 mg/100g) kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunmuştur (Durlu-Özkaya, 2001).

Yine bir başka çalışmada ise 7 ay depolanan Beyaz peynirlerde olgunlaşma sürecinde üretilen tek biojen aminin tiramin olduğu saptanmıştır. Depolama sürecinde oluşan tiramin miktarları kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunmuştur. Tiramin için kabul edilebilir limitler 100-800 mg/kg olarak verilirken denemede kullanılan Beyaz peynirlerde miktarlar 3780-4670 mg/kg gibi oldukça yüksek düzeylerde saptanmıştır. Örneklerin % laktik asit, % kurumadde, % KM yağ ve % KM tuz ile tiramin (mg/kg) derişimleri arasında önemli bir korelasyon ($r = 0,96$) bulunmuştur. Özellikle laktik asit düzeyinin artışı ile tiramin miktarı belirgin şekilde azalmaktadır (Karahan ve diğ., 2001).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN KİMYASALLAR

Sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, amonyum asetat, amonyak solusyonu ,perklorik asit, asetonyril (HPLC saflıkta) Merck firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan biojen amin standartları:

2-phenylethylamine hydrochloride: Fluka 77905

Putrecine dihydrochloride: Sigma P7505

Cadaverin dihydrochloride: Sigma 5351467

Tyriptamine hydrochloride: Fluka 93650

Spermidine tetrahydrochloride: Fluka 85580

Spermine tetrahydrochloride: Fluka 85607

Histamin dihydrochloride: Fluka 53300

Tyramine hydrochloride: Fluka 93820

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler

- 0,4 M Perklorik asit çözeltisi
- 2 M Sodyum hidroksit (NaOH)
- Doymuş Sodyum bikarbont (NaHCO₃)
- Dansil klorür çözeltisi:(200 mg 20 ml aseton içinde çözündürülür)
- Amonyak çözeltisi (NH₃, %25)
- Amonyum asetat 0,1 mol/L : Asetonyril karışımı : 1:1 (v:v) karıştırılır.
- Mobil faz A: Amonyum asetat 0,1 mol/L : Tam olarak 7,708 gr amonyum asetat tartılır ve ultra saf su ile 1000 ml' ye tamamlanır ve vakum süzme aparatı kullanılarak 0,45 um filtre ile süzülür. Çözelti haftalık olarak hazırlanır.
- Mobil faz B : Asetonyril, vakum süzme aparatı kullanılarak 0,45 um filtre ile süzülür.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- HPLC Cihazı: Biojen aminlerin belirlenmesi amacıyla Shimadzu HPLC cihazı kullanılmıştır.
- Homojenizatör: Peynir örneklerinin homojenize edilmesinde IKA T25 Digital ULTRA-TURBAX Model:T 250 D homojenizatör kullanılmıştır.
- Santrifüj: Peynir örneklerinin biojen aminlerin ekstraksiyonu sırasında faz ayırımının sağlanması amacıyla MPW High Speed Bruslee Centrifüje MPW-350R model santrifüj kullanılmıştır.
- Vorteks karıştırıcı: Türevlendirme işlemi sırasında homojen bir karışım elde etmek amacıyla VELP marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.
- İnkübatör: Peynir örneklerinin türevlendirilmesinde SELECTA marka inkübatör kullanılmıştır.

3.2.2. Standartların Hazırlanması

Tablo 3.1: Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan biojen amin miktarları.

Biojen Amin	Miktar(mg)
2-phenylethylamine hydrochloride	32,53
Putrecine dihydrochloride	45,72
Cadaverin dihydrochloride	43,00
Tyriptamine hydrochloride	30,69
Spermidine tetrahydrchoride	43,86
Spermine tetrahydrchoride	43,05
Histamine dihydrochloride	41,43
Tyramine hydrochloride	31,65

3.2.2.1. *Amin stok solüsyonları:*

Biojen aminler, Tablo 3.1’de verilen miktarlarda tartılarak 25 ml destile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu solüsyonların konsantrasyonu 1 mg /ml biojen amin olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2. *Standart çalışma solüsyonları:*

Çalışma solüsyonları, stok solüsyonların belli oranda seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki solüsyonlar ile biojen aminler için kalibrasyon hazırlanmıştır.

3.3. PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN BİOJEN AMİNLERİN EKSTRAKSİYONU

Metod Eorola vd, (1993) tarafından uygulanmış ve Senöz vd, (2000) tarafından modifiye edilmiştir. Homojenize örnekten 5 gr alınıp üzerine 10 ml perklorik asit solüsyonu eklenerek blendırda homojenize edildikten sonra 10 dakika 3000 devirde santrifüj edilmiştir. Üst tabaka süzülerek alınıp tekrar 10 ml perklorik asit solüsyonu ilave edilerek vortekste 1 dakika karıştırılmış ve son hacim perklorik asit solüsyonu ile 25 ml tamamlanmıştır.

3.4. TÜREVLENDİRME

5 ml’lik amber balon jöjelere 0,5 ml örnek veya mix standarttan (HPLC de 50 ppm okunacak mix standart için 100µg/ml’lik yani 100 ppm’lik Çalışma çözeltisi 1’den 50 µl alınır ve üzeri 450 µl perklorik asit ile tamamlanır. Son hacim 0,5 ml olur.) alınır. Üzerine 100 µl 2 N NaOH çözeltisi, 150 µl Doymuş Sodyum bikarbonat (NaHCO₃), ve 1 ml dansil klorür çözeltisi ilave edilerek 15 saniye vortekste karıştırılır. Karışım 45 dakika 40 °C’de etüvde inkübe edilir. Etüvden çıkan örnekler 10 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilir ve üzerlerine 50 µl %25’lik Amonyak (NH₃) çözeltisi ilave edilir. Karışım 15 saniye vortekste karıştırılır ve 30 dakika karanlıkta bekletilir. Süre sonunda 1:1 (v:v) amonyum asetat :asetonitril karışımı ile 5 ml’ye tamamlanır ve 30 saniye vortekste karıştırılır. Karışım şırınga yardımı ile 0,45 µm’luk filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınır ve okuma yapılır.

3.5. KROMATOĞRAFİK KOŞULLAR

Shimadzu HPLC cihazı

Enjeksiyon Miktarı: 20 µl

Akış hızı: 1,3 ml/dk

Kolon tipi: Phenomenex C18 (Inertsil ODS-3, 5 µm 4,6x250 mm)

Dedektör tipi: DAD

Kolon Fırını Sıcaklık: 40 °C

Taşıyıcı Faz A: 0,1 mol Amonyum asetat

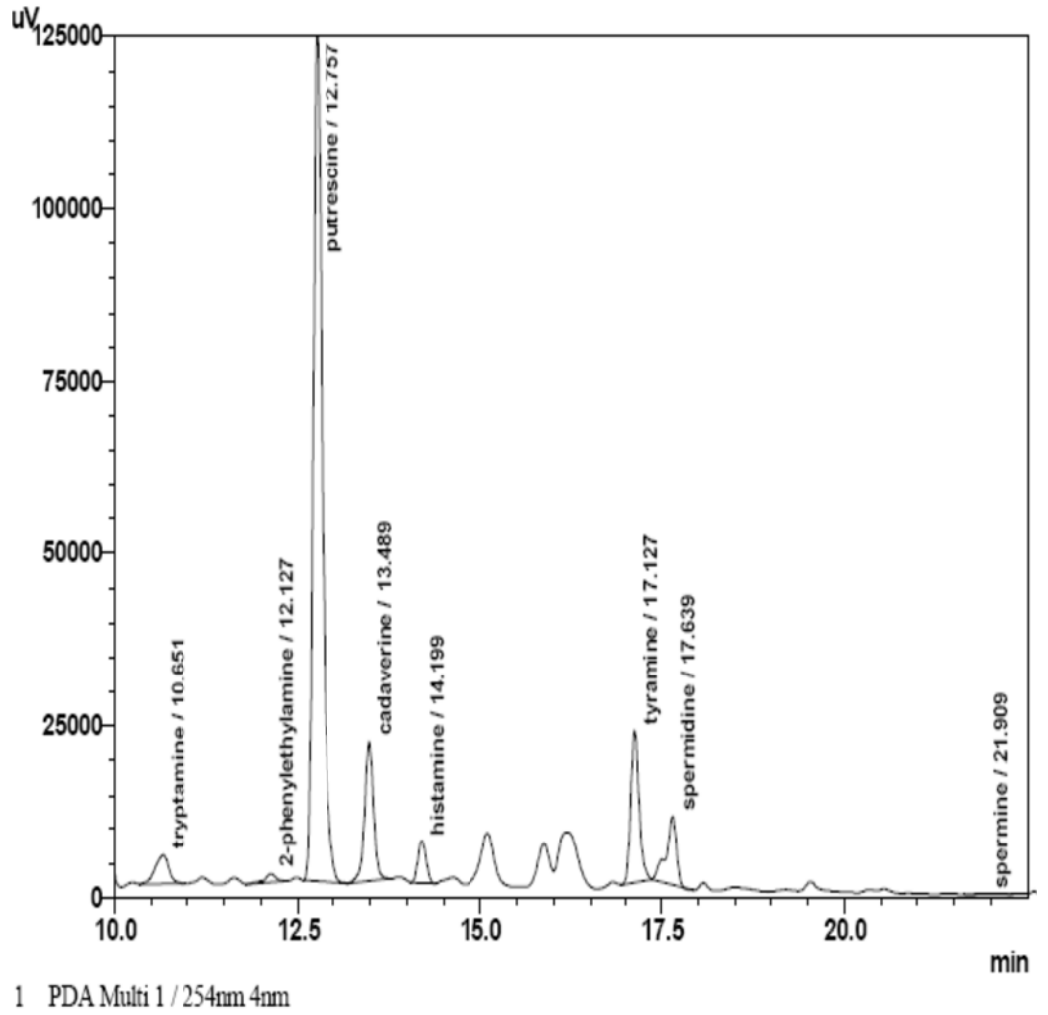
Taşıyıcı Faz B: Asetonitril (%50- %90 16. dakika, 16-22 dakika %90, 22-30 dakika %50 post run)

Dalga Boyu: 254 nm

Süre: 30 dk

4. BULGULAR

Peynir örnekleri iki paralel olarak çalışılmıştır ve bu değerlerin ortalaması alınarak gerekli veriler ve grafikler oluşturulmuştur. Şekil 4.1’de biojen aminlerin geliş zamanını gösteren örnek kromatogram verilmiştir. Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3’ de farklı kültürlerle üretilen peynirlerin, zamana bağlı biojen amin oluşum değerleri verilmiştir.



Şekil 4.1: Biojen aminlerin geliş zamanlarını gösteren örnek kromatogram.

Tablo 4.1: Termofilik kültür kullanımı sonucunda peynirdeki biojen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Depolama Süresi	Triptamin (mg/kg)	2-Feniletülamın (mg/kg)	Putresin (mg/kg)	Kadaverin (mg/kg)	Histamin (mg/kg)	Tiramin (mg/kg)	Spermidin (mg/kg)	Spermin (mg/kg)	Toplam Biojen Amin Miktarı (mg/kg)
8. GÜN	19,32	3,26	2,92	1,70	2,63	3,00	1,51	1,17	35,51
30. GÜN	19,47	5,73	5,94	1,34	2,74	3,36	2,03	1,04	41,65
60.GÜN	20,13	7,73	23,24	1,24	2,88	5,10	3,25	0,88	64,45
90. GÜN	20,33	7,71	32,17	1,39	3,00	7,00	3,74	0,00	75,34
120. GÜN	25,06	10,67	40,40	1,74	3,30	8,27	4,98	0,00	94,42
150. GÜN	27,99	14,50	73,14	1,63	12,82	8,74	6,17	0,00	144,99

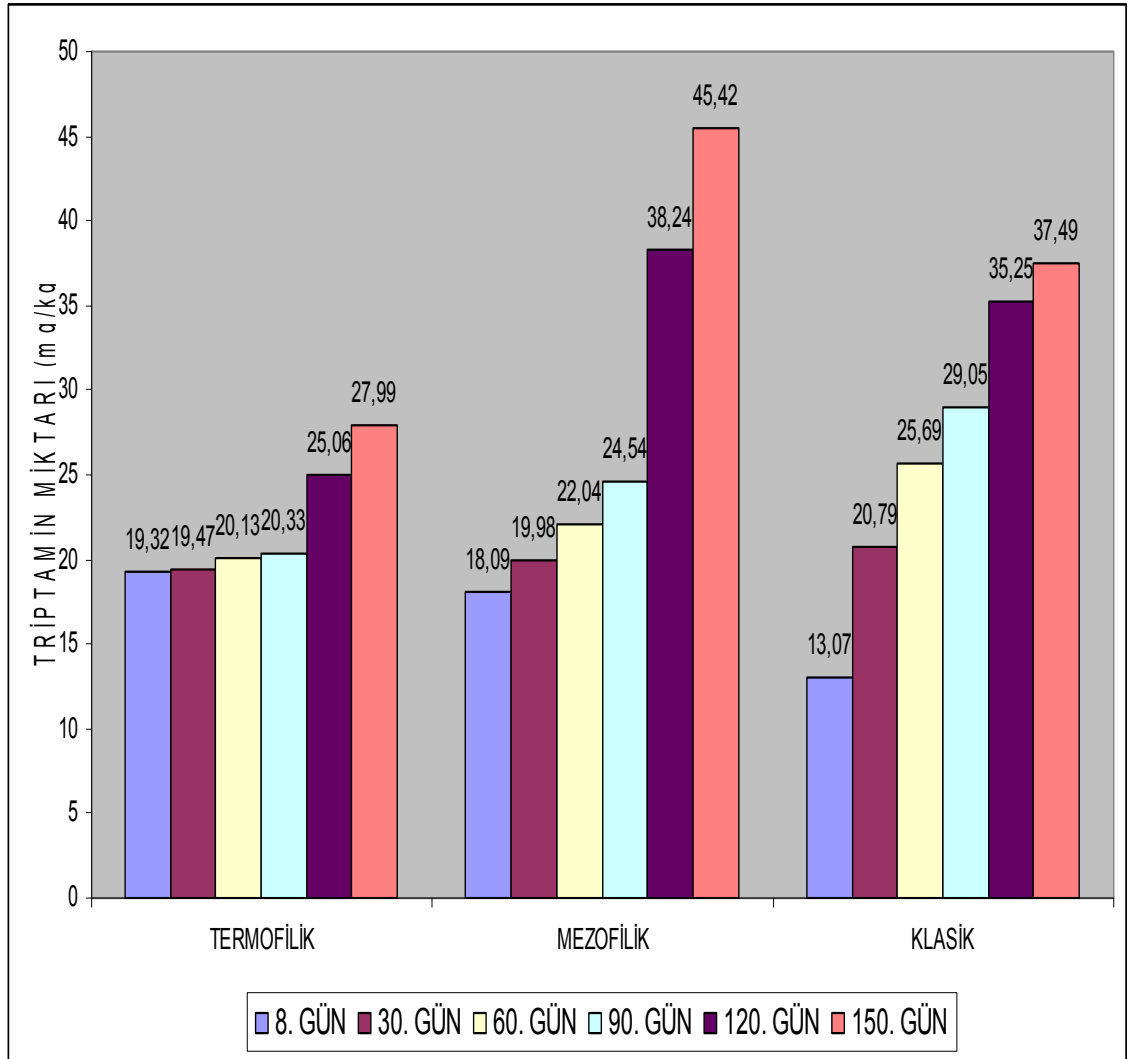
Tablo 4.2: Mezofilik kültür kullanımı sonucunda peynirdeki biojen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Depolama Süresi	Triptamin (mg/kg)	2-Feniletülamın (mg/kg)	Putresin (mg/kg)	Kadaverin (mg/kg)	Histamin (mg/kg)	Tiramin (mg/kg)	Spermidin (mg/kg)	Spermin (mg/kg)	Toplam Biojen Amin Miktarı (mg/kg)
8. GÜN	18,09	1,62	4,37	1,68	4,67	6,71	2,40	0,00	39,54
30. GÜN	19,98	1,54	12,76	2,44	5,05	13,97	4,50	0,98	61,22
60.GÜN	22,04	1,76	24,14	3,58	5,92	22,86	5,69	1,07	87,06
90. GÜN	24,54	1,91	37,91	3,71	6,74	26,80	6,23	1,07	108,91
120. GÜN	38,24	5,54	117,58	8,41	8,92	48,75	16,53	0,00	243,97
150. GÜN	45,42	4,92	181,25	12,00	12,93	76,25	24,76	1,35	358,88

Tablo 4.3: Klasik peynirdeki biyogen amin değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Depolama Süresi	Triptamin (mg/kg)	2-Feniletilamin (mg/kg)	Putresin (mg/kg)	Kadaverin (mg/kg)	Histamin (mg/kg)	Tiramin (mg/kg)	Spermidin (mg/kg)	Spermin (mg/kg)	Toplam Biyogen Amin Miktarı (mg/kg)
8. GÜN	13,07	0,75	11,42	1,68	0,15	7,53	2,11	0,00	36,71
30. GÜN	20,79	3,60	50,22	4,14	1,42	14,35	4,32	0,99	99,83
60.GÜN	25,69	4,78	75,01	4,45	3,32	16,64	9,52	0,96	140,37
90. GÜN	29,05	4,82	104,47	4,94	5,59	24,61	11,25	1,02	185,75
120. GÜN	35,25	5,48	117,95	8,09	6,64	34,52	14,52	1,05	223,50
150. GÜN	37,49	10,52	192,62	37,14	14,31	50,20	17,87	1,04	361,19

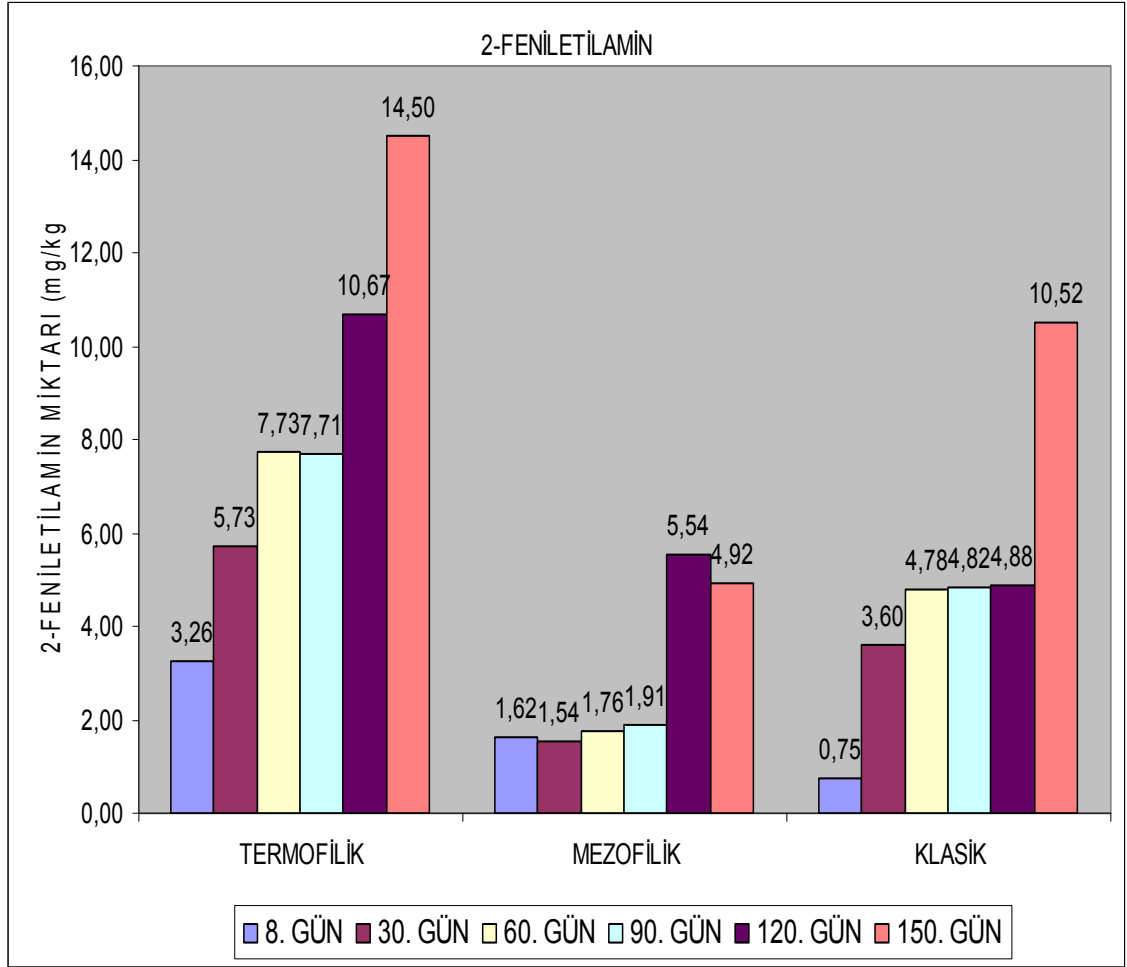
4.1. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE TRİPTAMİN MİKTARLARI



Şekil 4.2: Peşnir örneklerinde triptamin miktarları (mg/kg).

Peşnirler karşılaştırıldığında; en yüksek triptamin miktarı mezofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peşnirde ve 150. günün sonunda 45,42 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise klasik olarak üretilmiş beyaz peşnirde 8. günün sonunda 13,07 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2' de triptamin miktarlarının zamana bağlı grafiği veriştir.

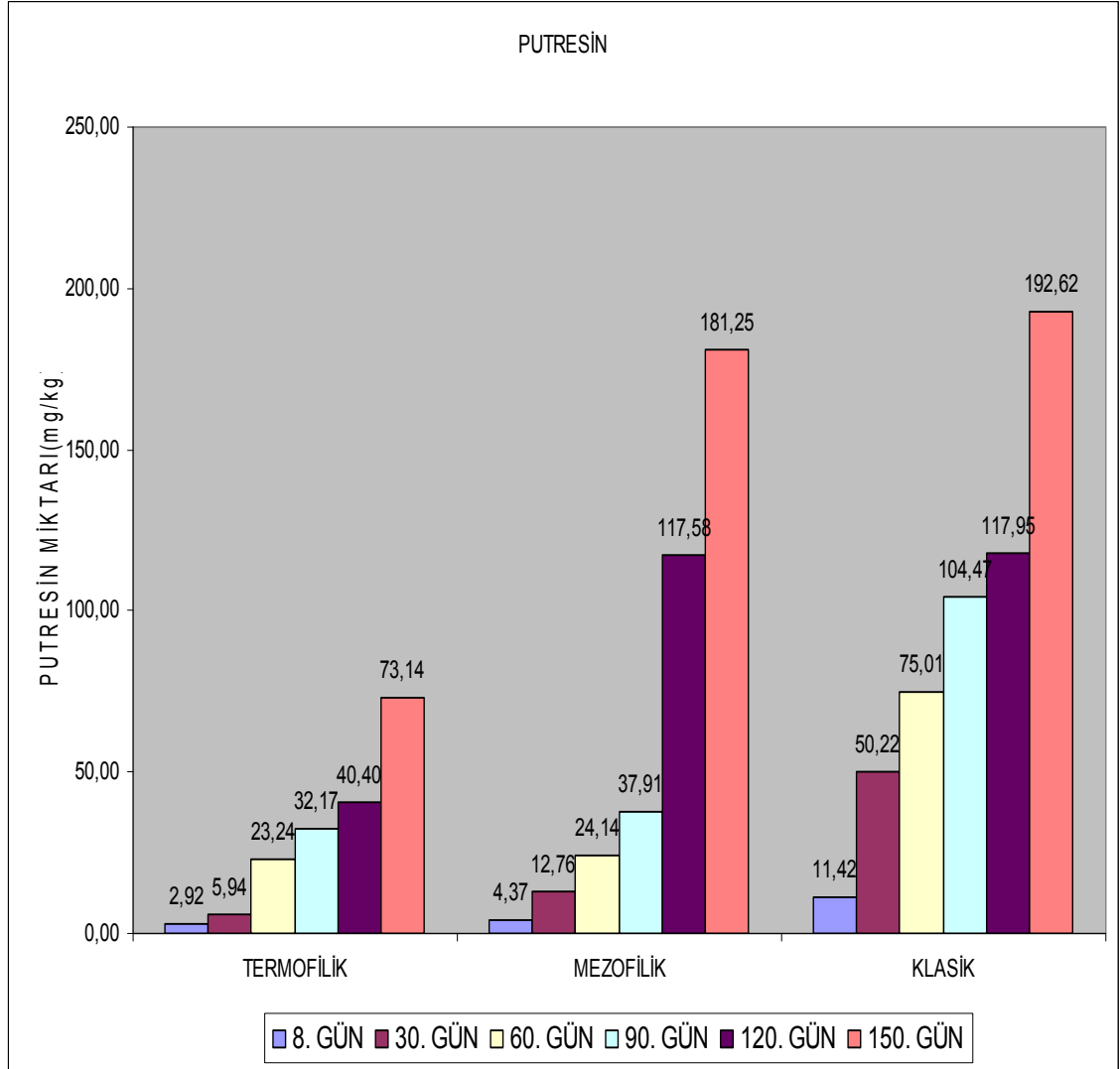
4.2. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE 2-FENİLETİLAMİN MİKTARLARI



Şekil 4.3: Peşnir örneklerinde 2-feniletılamin miktarları (mg/kg).

Peşnirler karşılaştırıldığında; en yüksek 2-feniletılamin miktarı termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peşnirde ve 150. günün sonunda 14,50 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise klasik olarak üretilmiş beyaz peşnirde 8. günün sonunda 0,75 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.3' de 2-feniletılamin miktarlarının zamana bağlı grafiği vermiştir.

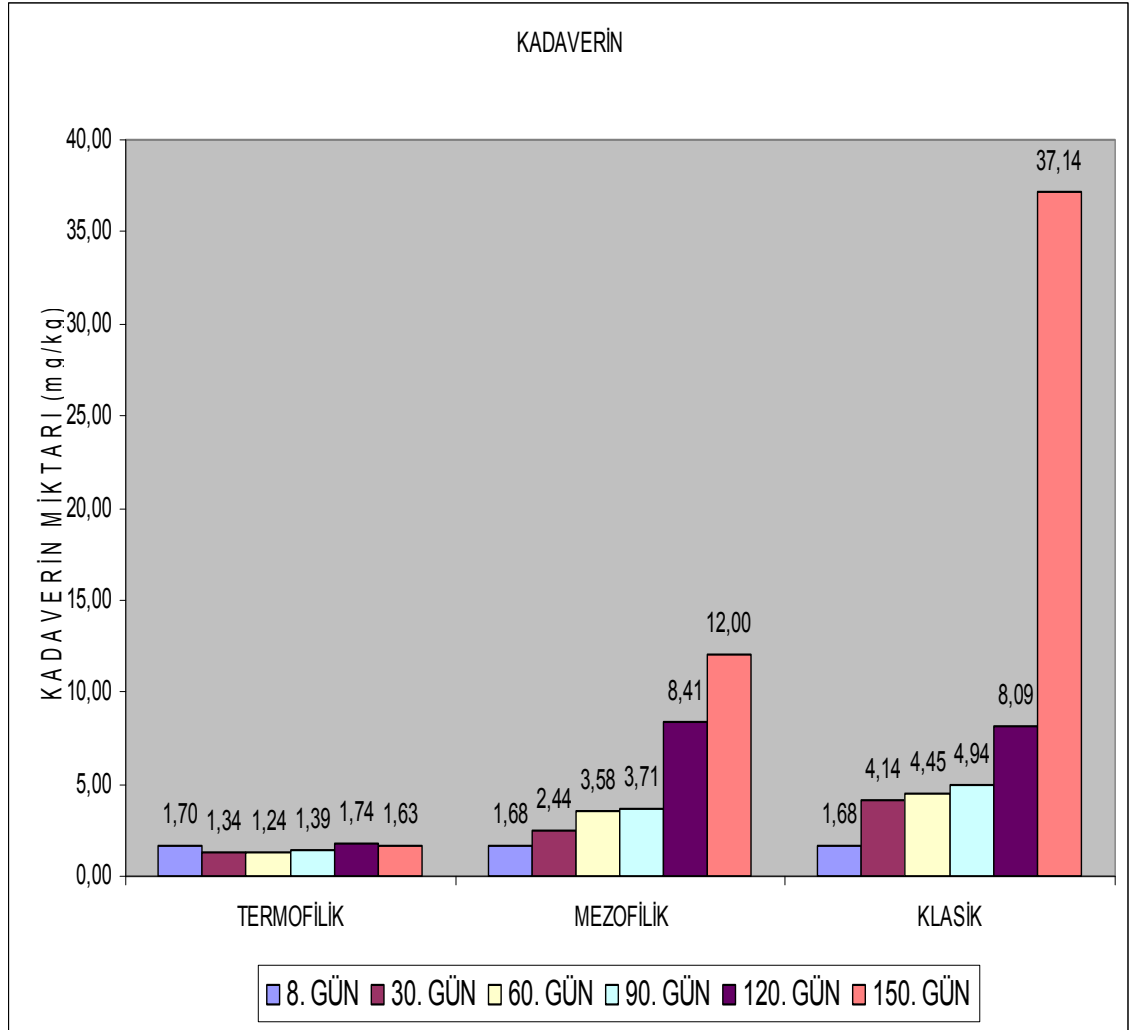
4.3. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE PUTRESİN MİKTARLARI



Şekil 4.4: Peynir örneklerinde putresin miktarları (mg/kg).

Peynirler karşılaştırıldığında; en yüksek putresin miktarı klasik olarak üretilmiş beyaz peynirde ve 150. günün sonunda 192,62 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirde 8. günün sonunda 2,92 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.4' de putresin miktarlarının zamana bağlı grafiğı verişmiştir.

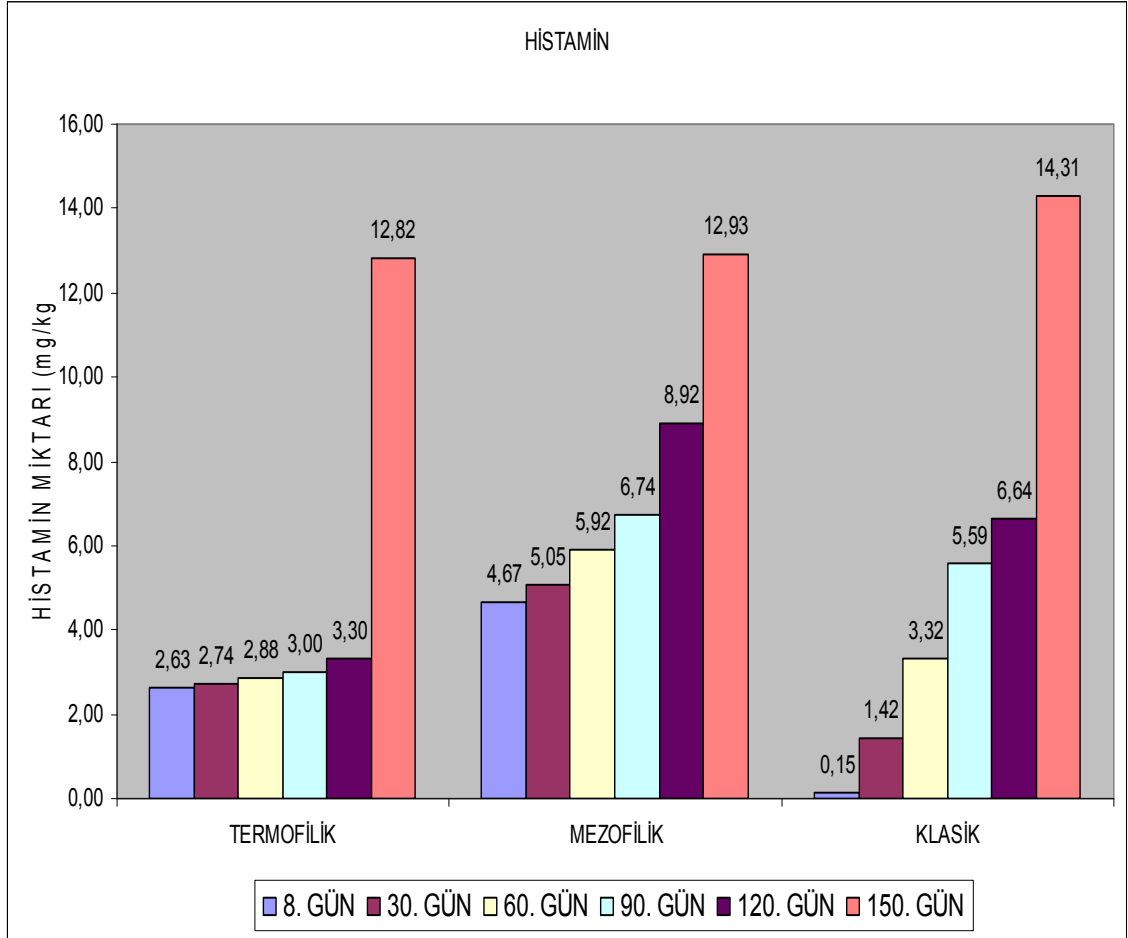
4.4. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE KADAVERİN MİKTARLARI



Şekil 4.5: Peynir örneklerindeki kadaverin miktarları (mg/kg).

Peynirler karşılaştırıldığında; en yüksek kadaverin miktarı klasik olarak üretilmiş beyaz peynirde ve 150. günün sonunda 37,14 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirde 60. günün sonunda 1,24 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.5' de kadaverin miktarlarının zamana bağlı grafiğı verişmiştir.

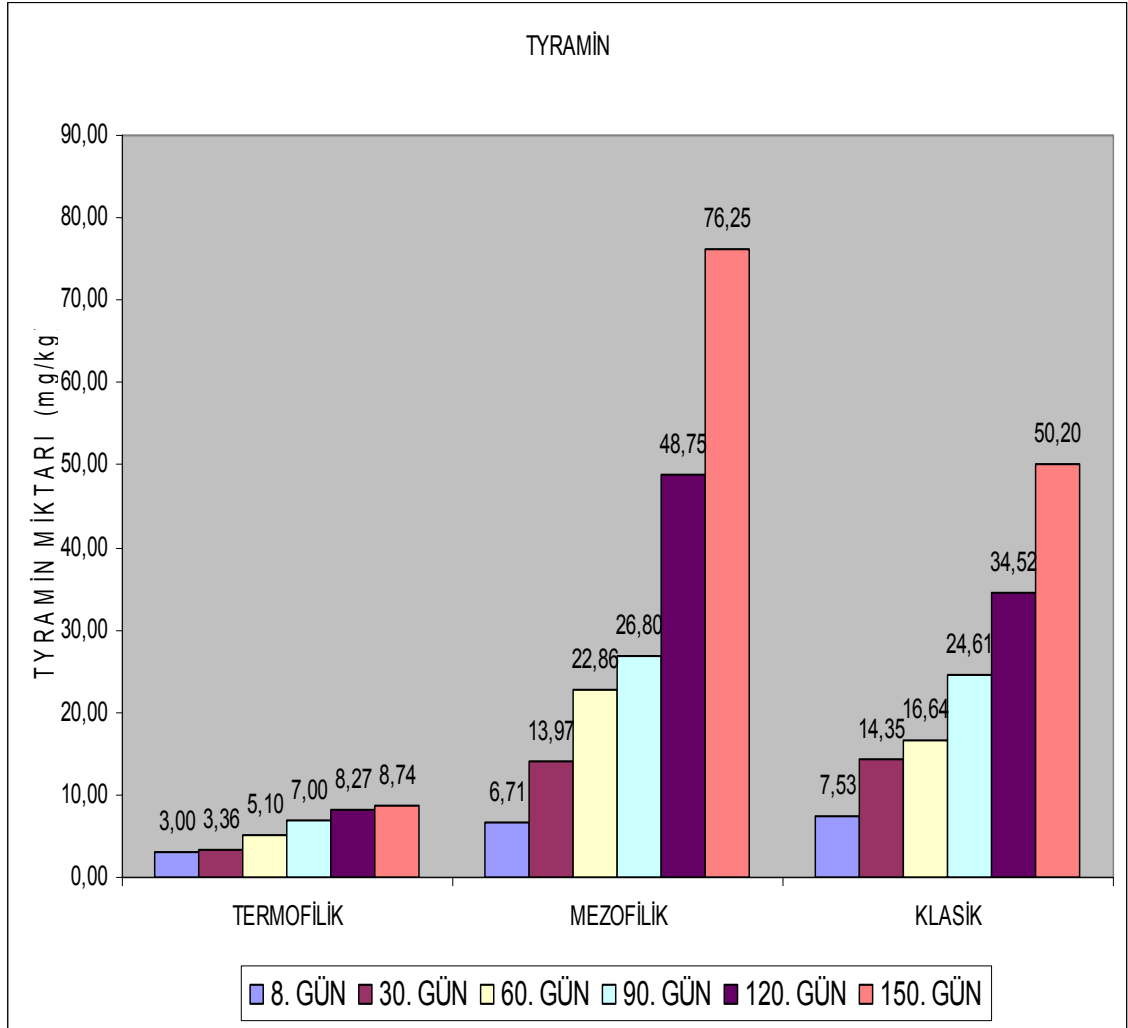
4.5. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE HİSTAMİN MİKTARLARI



Şekil 4.6: Peynir örneklerindeki histamin miktarları (mg/kg).

Peynirler karşılaştırıldığında; en yüksek histamin miktarı klasik olarak üretilmiş beyaz peynirde ve 150. günün sonunda 14,31 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise yine klasik olarak üretilmiş beyaz peynirde 8. günün sonunda 0,15 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.6' de histamin miktarlarının zamana bağlı grafiğı verişmiştir.

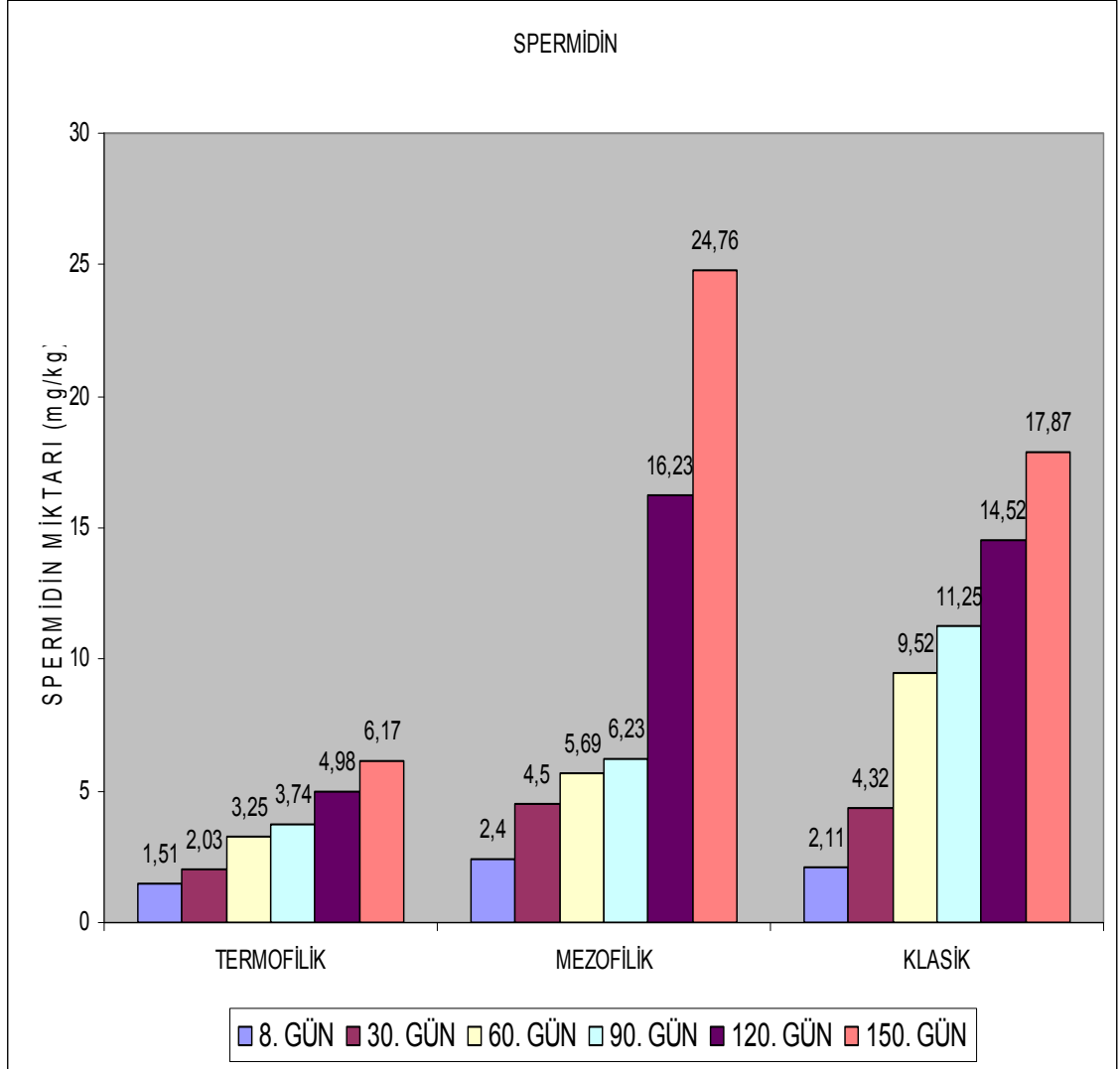
4.6. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE TİRAMİN MİKTARLARI



Şekil 4.7: Peynir örneklerindeki tiramin miktarları (mg/kg).

Peynirler karşılaştırıldığında; en yüksek histamin miktarı mezofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirde ve 150. günün sonunda 76,25 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirde 8. günün sonunda 3,00 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.7' de tiramin miktarlarının zamana bağlı grafiği verilmiştir.

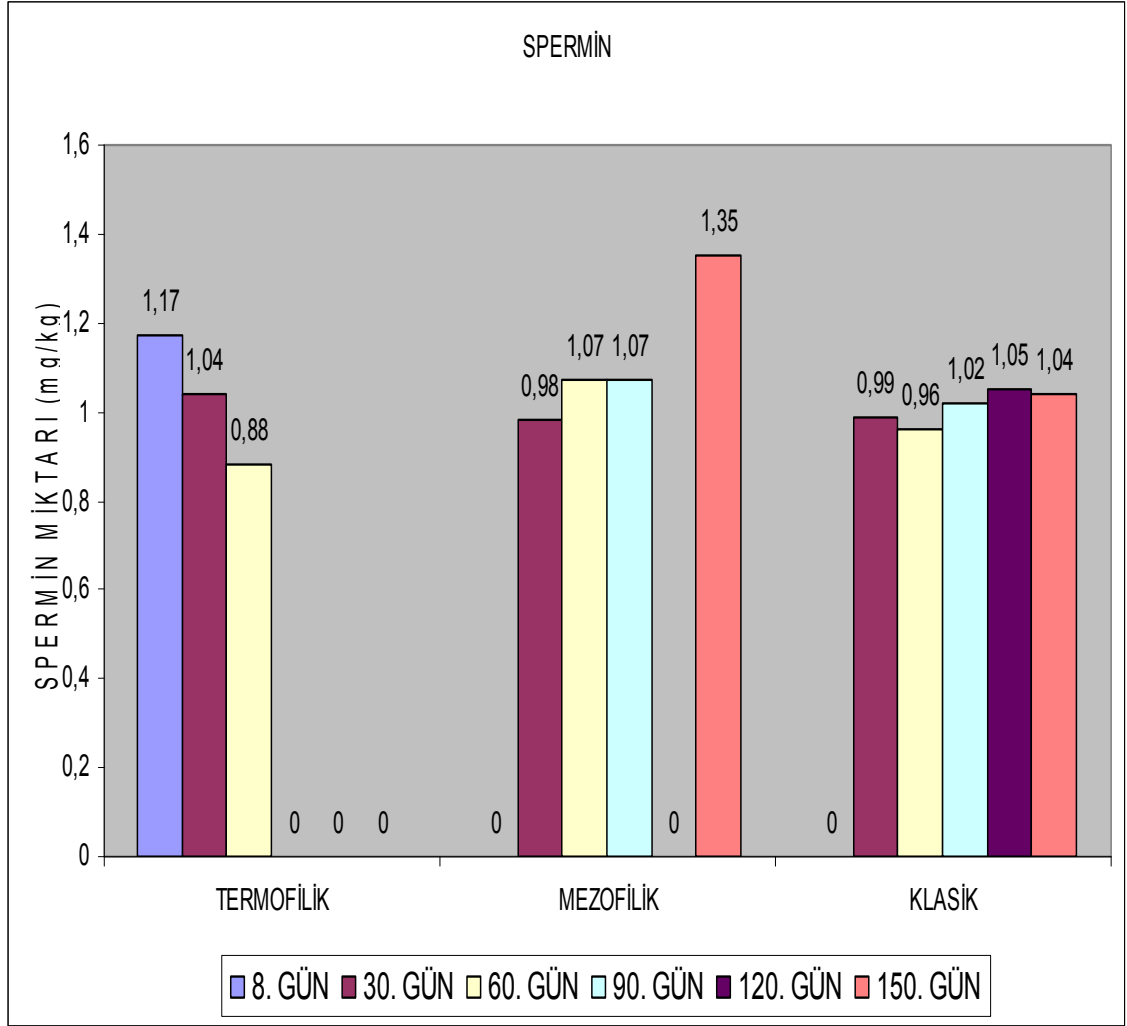
4.7. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE SPERMİDİN MİKTARLARI



Şekil 4.8: Peşnir örneklerindeki spermidin miktarları (mg/kg).

Peşnirler karşılaştırıldığında; en yüksek spermidin miktarı mezofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peşnirde ve 150. günün sonunda 24,76 mg/kg olarak belirlenmiştir. En düşük miktar ise termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peşnirde 8. günün sonunda 1,51 mg/kg olarak belirlenmiştir. Şekil 4.8' de spermidin miktarlarının zamana bağlı grafiğı verişmiştir.

4.8. PEYNİR ÖRNEKLERİNDE SPERMİN MİKTARLARI



Şekil 4.9: Peynir örneklerindeki spermin miktarları (mg/kg).

Peynirler karşılaştırıldığında; en yüksek spermin miktarı mezofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirde ve 150. günün sonunda 1,35 mg/kg olarak belirlenmiştir. termofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirin 90., 120. ile 150. günlerinin mezofilik starter kültür ile üretilmiş olan beyaz peynirin 8. ile 120. günlerinin ve klasik olarak üretilmiş olan beyaz peynirin 8. günün sonunda spermin tespit edilmemiştir. Şekil 4.9' de spermin miktarlarının zamana bağlı grafiği verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, beyaz peynir üretiminde kullanılan starter kültürler ve bu starter kültürlerin olgunlaşma süresinin bazı biojen aminlerin (triptamin, β -feniletilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin, spermin) oluşumuna etkileri incelenmiştir.

Bu çalışma için üretilmiş peynirlerde en yüksek konsantrasyona sahip biojen aminler, sırasıyla, putresin , tiramin, triptamin ve kadaverin olarak saptanmıştır. Belirlenen değerler içerisinde hepsinde yakın konsantrasyon aralığına sahip biojen aminin histamin, rastlanma sıklığı en düşük biojen aminin ise spermin olduğu görülmüştür.

3 farklı peynirde de triptamin miktarlarında ve artışında çok belirgin farklılıklar gözlenmemiştir. 2-feniletilamin mezofilik starter kültürü kullanılan peynirde çok fazla artış göstermemesine karşın, en fazla artışı klasik peynirde göstermiştir. Putresin her 3 peynir için de başlangıç miktarına göre oldukça büyük artış yapmıştır. Kadaverin termofilik starter kültürü kullanılan peynirde depolama süresince sabit değerlerde seyretmiştir, mezofilik starter kültürü kullanılan peynirde artış gösterse de klasik olarak üretilmiş peynir kadar artış göstermemiştir. Histamin miktarı klasik olarak üretilmiş peynirde başlangıçta oldukça düşükken depolama süresi sonunda diğer peynirlerle hemen hemen aynı değerlere ulaşmıştır. Tiramin termofilik starter kültürü kullanılan peynirde depolama süresince yavaş bir artış göstermiştir, mezofilik starter kültürü kullanılan peynirde hızlı artış göstermiştir ve klasik olarak üretilmiş peynirden daha fazla oranda artış göstermemiştir. Spermidin termofilik starter kültürü kullanılan peynirde depolama süresince büyük oranda artış göstermemiştir, mezofilik starter kültürü kullanılan peynirde artış göstermiştir ve klasik olarak üretilmiş peynirden daha fazla oranda artış göstermiştir. Son olarak spermin her 3 peynir için de yaklaşık aynı değerlerde seyretmiştir ve artış göstermemiştir.

Biojen amin içeriğinin olgunlaşma süresince artması beklenen bir olaydır. Oluşan bu biojen aminler üründeki bozulmanın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle de ürünlerin toplam biojen amin içeriği incelendiğinde mezofilik kültür kullanılarak üretilen ve klasik olarak üretilen peynir örneklerinin, termofilik kültür kullanılarak üretilen peynir örneğine göre daha çabuk bozulduğu söylenebilir.

Daha önce de belirttiğimiz gibi; Histamin için yasal üst sınırı 1 kg gıdada 100 mg veya 1 litre içkide 2 mg, Tiramin için bu değer, 100-800 mg/kg ; feniletilamin için ise 30 mg/kg' dır. Bu değerler dikkate alındığında; etkisi en yüksek biojen amin olan histamin her 3 örnekte de belirgin bir artış göstermemiş ve miktarı toksik dozun altında kalmıştır. 2-feniletilamin için verilmiş olan toksik doz 30 mg/kg'dır ve örneklerin hiç biri bu değeri geçmemiştir. Tiramin değerleri de verilen toksik doz olan 100-800 mg/kg 'ın altında kalmıştır.

Hijyen indikatörü olarak tanımlanan putresin çok düşük değerlerdeyken, zamanla ani artışlar göstermiş ve süre sonunda da her 3 örnek için de en yüksek biojen amin değerine ulaşmıştır.

Gıdalarla alınan toplam biojen amin miktarının 1000 mg/kg düzeyinde olması halinde insan sağlığı açısından risk taşıdığı belirtilmiştir (Silla-Santos, 1996). Buna göre de çalışmamızda kullanılan peynir örneklerinin belirtilen zaman sonlarında bu değerlere ulaşmadığı ve sağlık açısından da çok ciddi bir risk taşımadığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Allen, D.G., 2004, *Regulatory control of histamine production in north carolina harvested mahi-mahi (Coryphaena Hippurus) and yellowfin tuna (Thunnus Albacares)*, A HACCP-Based Industry Survey a thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science department of food science.
- Antila, P., Antila, V., Mattila, J., Hakkarainen, H., 1984, Biogenic amines in cheese.I: Determination of biogenic amines in Finnish cheese using high performance liquid chromatography, *Milchwissenschaft*, 39, 81-85.
- Aydın, B., 2006, *Mamul gıdalarda biojenik aminlerin belirlenmesi*, Kimya Anabilim Dalı Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi.
- Ayhan, K., Kolsarıcı, M. ve Alsancak-Özkan, G., 1999, The effects of a starter culture on formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks, *Meat science*, 53, 183-188.
- Beutling, D., 1994, Biogene amine in ernahrung, *Archiv für lebensmittelhygiene*, 47, 97-101.
- Busto O, Valero Y, Guasch J, Borrull F., 1994, Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC, *Chromatographia*, 38(9-10) 571-578.
- Chang, S.F., Ayres, J.W. and Sandine, W.E., 1985, Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane, *Journal of dairy science*, 68, 2840-2846.
- Çolak, H. ve Aksu, H., 2002, Gıdalarda biojen aminlerin varlığı ve oluşumunu etkileyen faktörler, *Yüüncü yıl üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 13(1-2), 35-40.
- Çolak, H. ve Ugur, M., 2002, Farklı muhafaza sıcaklığı ve süresinin fermente sucuklarda biojen aminlerin oluşumu üzerine etkisi, *Turkish journal of veterinary and animal sciences.*, Tübitak, 26, 779-784.
- Demirci, M., Şimşek, O., Taşan, M., 1994, Ülkemize yapılan muhtelif tip yerli peynirler. her yönüyle peynir, *Trakya üniversitesi tekirdağ ziraat fakültesi yayınları*, 125, 273-281.
- Denli, Y. ve Anlı, R. E., 1998, Şarap ve birada biojen aminlerin oluşumu ve önemi, *Gıda*, 23(5), 323-327.

- Diaz-Cinco, M.E., Frajlo, O., Grajeda, P., Lazano-Taylor, J., Gonzales De Mejia, E., 1992, Microbial and chemical analyses of Chihuahua cheese and relationships to histamine and tyramine, *Journal of food science*, 57 (2), 335-356.
- Durlu-Özkaya, F., Alichanidis, E., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tunail, N., 1999, Determination of biogenic amine content of Beyaz cheese and biogenic amine production ability of some lactic acid bacteria, *Milchwissenschaft*, 54(12), 680-682.
- Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K., Özkan, G., 2000, Biogenic amine determination in Tulum cheese by high performance liquid chromatography (HPLC), *Milchwissenschaft*, 55 (1), 27-28.
- Durlu-Özkaya F. ve Tunail N., 2000, *Salamura beyaz peynirlerde biyogen amin risk, Süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri*, Tekirdağ, VI. Süt ve süt ürünleri sempozyumu tebliğler kitabı, Mehmet Demirci (ed), 146-153.
- Durlu-Özkaya, F., 2001, *Salamura Beyaz peynirlerden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K. ve Vural, N., 2001, Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products, *Meat science*, 58, 163-166.
- Edwards, S.T. and Sandine, W.E., 1981, Public health significance of amines in cheese, Microbial metabolites of importance in dairy products, *Journal of dairy science*, 64, 2431-2438.
- El-Sayed M., 1996, Biogenic amines in processed cheese available in Egypt, *International dairy journal*, 6, 1079-1086.
- Eralp, M., 1974, *Peynir teknolojisi*, A.Ü.Basımevi, Ankara, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını:533, 331s.
- Erkan, N., 2004, Biojen aminler ve su ürünleri için önemi, *TSE standart ekonomik ve teknik dergi*, 506, 84-93.
- Fox, P.F. and Wallace, J.M., 1997, Formation of flavor compounds in cheese, *Advances in applied microbiology*, 45, 17-85.
- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W., 1994, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in food science and technology*, 5, 42-49.
- Hayaloğlu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., 2002, Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese, *International dairy journal*, 12, 635-648.
- Hotchkiss, J. H., 1989, Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages, *Cancer surv*, 8, 293-321.

- Hwang, D. F., Chang, S. H., Shiua, C. Y. and Chai, T., 1997, High performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning, *Journal of chromatography B*, 693, 23-30.
- Gloria, M. B. A., Watson, B. T., Simon-Sarkadi, L. and Daeschel, M. A., 1998, A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines, *American journal of enology and viticulture*, 49(3), 279-282.
- Gloria, M. B. A. and Izquierdo-Pulido, 1999, Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers, *Journal of food composition and analysis*, 12, 129-136.
- Joosten, H.M.L.J. and Northolt, M.D., 1987, Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria, *Netherland milk dairy journal*, 41, 259-280.
- Joosten H.M.L.J. and Van-Boekel, M.A.J.S., 1988, Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 4. A study of the kinetics of histamine formation in an infected Gouda cheese, *Netherland milk dairy journal*, 42, 3-24.
- Joosten, H.M.L.J., 1988a, Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed, *Netherland milk dairy journal*, 41, 329-345.
- Joosten H.M.L.J., 1988b, Biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance, *Netherland milk dairy journal*, 42, 25-42.
- Karahan, A.G., Öner, Z., Filiz, H.N., 2001, Farklı depolama sürelerinde beyaz peynirlerde meydana gelen değişimler, *Kromatografik yöntemler*, II. Ulusal Kromatografi Kongresi, 316-326.
- Keব্য, K.M.K., El-Sonbaty, A.H., Badawi, R.M., 1999, Effect of heating milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free amino acids developmen, *Food chemistry*, 64, 67-75.
- Lehtonen, P., 1996, Determination of amines and amino acids in wine a review, *American journal of enology and viticulture*, 47(2), 127-133.
- Leuschner, R. G. K. and Hammes, W. P., 1999, Formation of biogenic amines in mayonnaise, herring and tuna fish salad by Lactobacilli, *International journal of food science and nutrition*, 50, 159-164.
- Lonvaud-Funel, A., 2001, Biogenic amines in wines role of lactic acid bacteria, *FEMS microbiology letters*, 199, 9-13.
- Maijala R., Eerola S., 1993, Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine, *Meat science*, 35, 387-395.
- Maijala R., Eerola S., Aho M, Hirn J., 1993, The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat, *Journal of food protection*, 56 (2), 125-9.

- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S. and Rondinini, G., 2000, The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese, *Letters in applied microbiology*, 31, 169-173.
- Mehenna, N.M., Antilla, P., Pahkala, E., 1989, High performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in Egyptian cheeses, *Journal of dairy science*, 17, 19-26.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T. and Conte, L. S., 2005, A Survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables, *Food chemistry*, 89, 355-361.
- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M. T. and Vidal-Carou, M. C., 2000, Biogenic amines and polyamines in milk and Cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 5117-5123.
- Ordenez, A. I., Ibanez, F. C., Torre, P. and Barcina, Y., 1997, Formation of biogenic amines in Idiazabol Ewe's Milk cheese: Effect of Ripening, Pasteurization and Starter, *Journal of food*.
- ÖLMEZ, H. K., 2000, Biojenik aminler, *Dünya yayınları gıda dergisi*, 6 (5), 51-57.
- Özdestan, Ö., 2004, *Benzoil türevleri kullanılarak biojen aminlerin yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özdestan, Ö., Üren A., 2006, Biojen amin analiz yöntemleri, *Türkiye 9. gıda kongresi*, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 325-327.
- Özogul, F., Küley, E. ve Özogul, Y., 2004, Balık ve balık ürünlerinde oluşan biojen aminler, *Ege üniversitesi su ürünleri dergisi*, 21(3-4), 375-381.
- Petaja, E., Eerola, S. & Petaja, P., 2000, Biogenic amines in cold-smoked fish fermented with lactic acid bacteria, *European food research and technology*, 210, 280-285.
- Polat, G., 2001, *Ankara piyasasında satılan Civil peynirlerinin mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşal niteliklerinin saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Roig-Sagués, A.X, Molina, P.A., Hernández-Herrero, M., 2002, Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses, *European food research and technology*, 215, 96-100.
- Rosenthal, I., 1991, *Milk and dairy products (Properties and processing)*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (Federal Rep. of Germany), 115-135.
- Ruiz-Capillas, C. & Jimenez-Colmenero, F., 2004, Biogenic amines in meat and meat products, *Critical reviews in food science and nutrition*, 44, 489-499.

- Santos, S., 1996, Biogenic amines their importance in foods, *International journal of food microbiology*, 29, 213-231.
- Shakila R., Vasundhara T. and Kumudavally K., 2001, A comparison of the TLC densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products, *Food chemistry*, 75, 255-259
- Shalaby, A., 1996, Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food research international*, 29, 675-690.
- Silla Santos, M. H., 1996, Biogenic amines their importance in foods, *International journal of food microbiology*, 29, 213-231.
- Sumner, S.S., Roche, F. and Taylor, S.L., 1990, Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*, *Journal of dairy science*, 73, 3050-3058.
- Taylor, L.S. ve Woychik, A.N., 1982, Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae, *Journal of food protection*, 45(8), 747-751.
- Taylor, S.L., Keefe, T.J., Windham, E.S., Howell, J.F., 1982, Outbreak of histamine poisoning associated with consumption of Swiss cheese, *Journal of food protection*, 45(5), 455-457.
- Teodorovic V., Buncic S., Smiljanic D., 1994, A study of factors influencing histamine production in meat, *Fleischwirtsch.*, 74 (2), 170-172.
- TURANTAŞ, F., ÖKSÜZ, A., 1998, Balık ve balık ürünlerinde biogenik aminler ve amin üretiminde rol oynayan bakteriler, *Gıda teknolojisi*, 3(5), 58-65.
- Üçüncü, M., 1999, *Süt teknolojisi II. bölüm*, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi yayınları No: 32, İzmir, 210.
- Üçüncü, M., 2004, *A'dan Z'ye peynir teknolojisi*, 490-510
- Vale, S., Gloria M., 1997, Determination of biogenic amines in cheese, *Journal of AOAC international*, 80(5), 1006-1012.
- Vale, S. and Gloria, B.A., 1998, Biogenic amines in Brazilian cheeses, *Food chemistry*, 63(3), 343-348.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., Polychroniadou, A., 2000, Biogenic amine production in Feta cheese, *Food chemistry*, 71, 259-266.
- Vinci, G. and Antonelli, M. L., 2002, Biogenic amines quality index of freshness in red and white meat, *Food control*, 13, 519-524.
- Walstra, P., Naomen, A., Geurtus, T.J., 1993, *Cheese chemistry, physics and microbiology, Volume 2*, Dutch-type Varieties. In, P.F. Fox (Editor), Department of Food Chemistry University College, Chapman and Hall, London, 39-82.

Yaygın, H., Kılıç, S., 1993, *Süt endüstrisinde saf kültür*, Altındağ Matbaacılık, İzmir, 108.

Yetişmeyen, A., 1997, *Süt teknolojisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1420, Ankara.

Yurdagül, S. ve Bozoglu, T. F., 2001, Şarap endüstrisinde malolaktik fermantasyonun önemi, *Gıda teknolojisi*, 5(2),72-77.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Derya GÜNEY
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	1981, Erzincan
Telefon	0506 313 4024
E-mail	dguney28@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı/Organik Kimya Programı	2009
Lisans	Kimya	2004
Lise	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	1999