ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STARTER KÜLTÜR KULLANILARAK ÜRETİLEN HIYAR TURŞULARINDA BİYOJEN AMİN OLUŞUMU ÜZERİNE ARAŞTIRMA

Zeynep TURGUT

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2006

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STARTER KÜLTÜR KULLANILARAK ÜRETİLEN HIYAR TURŞULARINDA BİYOJEN AMİN OLUŞUMU ÜZERİNE ARAŞTIRMA

Zeynep TURGUT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Bu çalışmada, hem doğal fermantasyon yoluyla hem de *Lactobacillus plantarum* 11B starter kültürü kullanılarak hıyar turşusu üretimi yapılmış ve fermantasyon süresince oluşan biyojen aminlerin miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca belirli günlerde alınan örneklerde toplam mezofilik aerobik bakteriler (TMAB), laktik asit bakterileri (LAB), enterobakteri ve koliform grubu bakteriler ile maya-küf sayımları ve pH, titrasyon asitliği ve tuz gibi kimyasal analizler de yapılmıştır.

Starter katılarak üretilen hıyar turşusu örneklerinde pH 3,43, titrasyon asitliği % 0,88, tuz % 4,20; kontrol örneklerinde pH 3,45, titrasyon asitliği % 0,98 ve tuz % 4,15 olarak bulunmuştur. Fermantasyon süresince en yüksek LAB, TMAB ve maya sayıları starterli örneklerde, sırasıyla, 8,58, 8,55 ve 4,75 log kob/mL; kontrol örneklerinde, sırasıyla, 8,35, 8,32 ve 5,56 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Küf, enterobakteri ve koliform sayım sonuçları 1 log kob/mL' den düşük bulunmuştur. Denemede kullanılan *Lactobacillus plantarum* 11B' nin MRS sıvı besiyerinde oluşturduğu toplam biyojen amin miktarının 0,413 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Fermantasyonun bitiminde starter katılan örneklerde, sırasıyla, putresin (11,863 µg/mL-salamura), feniletilamin (4,633 µg/mL-salamura) ve triptamin (1,936 µg/mg-meyve); kontrol örneklerinde ise feniletilamin (29,817 µg/mL-salamura), putresin (20,492 µg/mg-meyve) ve triptamin (9,246 µg/mL-salamura) en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminler olarak belirlenmiştir. Spermin ve histamin düzeylerinin ise doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinde (sırasıyla 6,536 µg/mL-salamura ve 3,810 µg/mg-meyve) starter katılarak üretilen hıyar turşularına kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kontrol örneklerindeki feniletilamin miktarları hariç, feniletilamin, putresin, histamin, tiramin ve toplam biyojen amin miktarlarının toksik limitlerin altında olduğu anlaşılmıştır.

2006, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Turşu, biyojen amin, fermantasyon, HPLC, laktik asit bakterileri

ABSTRACT

Master Thesis

A RESEARCH ON FORMATION OF BIOGENIC AMINE IN CUCUMBER PICKLES PRODUCED BY USING STARTER CULTURE

Zeynep TURGUT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

In this study, cucumber pickle was produced by spontaneous fermentation or using *Lactobacillus plantarum* 11B as starter culture, then amount of biogenic amines, which were produced during fermentation, was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Additionally, on certain days during fermentation, enumeration of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), lactic acid bacteria (LAB), enterobacteria, coliforms and yeast-mold were performed, as well as the chemical analyses such as pH, titration acidity and salt.

The pH, titration acidity and salt content of the samples produced by adding starter culture were found as 3.43, 0.88% and 4.20%, respectively, while those of control samples were 3.45, 0.98% and 4.15%, respectively. The highest LAB, TMAB and yeast counts during fermentation in starter added samples were 8.58, 8.55 and 4.75 log cfu/mL, respectively; in control samples those were 8.35, 8.32 and 5.56 log cfu/mL, respectively. Mold, enterobacteria and coliform counts were found lower than 1 log cfu/mL. *Lactobacillus plantarum* 11B strain, which was used as starter culture for the experiments, produced 0.413 µg/mL total biogenic amine in MRS broth. At the end of the fermentation period, putrescine (11.863 µg/mL-brine), phenylethylamine (4.633 µg/mL-brine) and tryptamine (1.936 µg/mg-fruit) were determined as the biogenic amines which had the highest concentration in starter added samples. Whereas phenylethylamine (29.817 µg/mL-brine), putrescine (20.492 µg/mg-fruit) and tryptamine (9.246 µg/mL-brine) displayed the highest concentrations in control samples. On the other hand, spermine and histamine levels were higher in control samples (6.536 µg/mL-brine and 3.810 µg/mg-fruit, respectively) produced by spontaneous fermentation than the samples produced by adding starter culture. It was determined that phenylethylamine, putrescine, histamine tyramine and total biogenic amine contents of the samples were lower than the toxic limits, except the phenylethylamine content of control samples.

2006, 72 pages

Key Words: Pickle, biogenic amine, fermentation, HPLC, lactic acid bacteria

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, bu araştırmanın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile öneri ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN' a, bilgi ve desteği ile maddi ve manevi her zaman yanımda olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Serap COŞANSU' ya, hem laboratuvar çalışmalarımdaki yardımları hem de araştırmada kullanılan kültürü sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK' e, tez projemin desteklenmesinde BİTAUM başkanı Sayın Prof. Dr. Tamer BAYKARA' ya, biyojen amin analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardım ve katkılarından dolayı Sayın Uzman Nilüfer VURAL' a, istatistik analiz aşamasındaki yardım ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Fikret GÜRBÜZ ve Araş. Gör. Özgür KOSKAN' a, laboratuvar çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Ziraat Müh. K. Özgür ERGEN, Gıda Yüksek Müh. L. Gözlem AKBAŞ ve Laborant Mustafa GAYRETLİ' ye, mikrobiyoloji biriminde çalışan tüm arkadaşlarıma ve çalışanlarına, öğrenim hayatım süresince beni destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, "BİTAUM Ücretsiz Analiz Projesi" olarak Ankara Üniversitesi BİTAUM tarafından desteklenmiş ve biyojen amin analizleri BİTAUM Kromotografi Ünitesi Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Zeynep TURGUT
Ankara, Haziran 2006

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

1. GİRİŞ

Çeşitli meyve ve sebzelerden turşu yapımı çok eski zamanlardan beri bilinen ve uygulanan bir gıda üretim şeklidir. Sebze ve meyveler laktik asit fermantasyonuna uğratılarak hem dayanıklı hale getirilmekte hem de tat, koku ve kullanım bakımından farklı olan gıda maddelerine dönüştürülmektedir. Bu şekilde laktik asit fermantasyonuna uğratılan meyve ve sebzeler bol ve ucuz oldukları mevsimlerde bu yolla değerlendirilerek, taze olarak bulunmadıkları dönemlerde tüketime sunulabilmektedir (Çalış ve Akbulut 1992).

Hıyar turşusu "turşuluk hıyarların (*Cucumis sativus*), sirke ve/veya salamura içindeki laktik asit fermantasyonu ile veya sulandırılmış asetik asit içinde bekletilerek gerektiğinde çeşni maddeleri, katkı maddeleri ilavesiyle elde edilen mamuldür" şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim 1993). Turşu yapımında starter kültür kullanımı iyi bir fermantasyon ve standart kalitede turşu elde etmenin başta gelen koşuludur (Çalış ve Akbulut 1993, Özçelik ve İç 1996).

Biyojen aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve keton gruplarının transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir. Gıdalarda yüksek miktarda biyojen amin varlığı, çoğunlukla mikrobiyel aktivite ile açıklanmakta olup, istenmeyen fizyolojik etkilere bağlı rahatsızlıkların yanı sıra, hijyenik olmayan üretim koşullarını göstermesi açısından da önemlidir. Yüksek sıcaklık, serbest amino asit varlığı, tuz miktarı, starter kültür konsantrasyonu, olgunlaşma, ısıl işlem ve oksijen gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen önemli faktörler arasındadır (García-García *et al*. 2001). Aminler termal stabiliteye sahip oldukları için gıdalarda bir kez oluştuktan sonra parçalanmaları oldukça zordur. Çoğunlukla gıda maddelerinin işlenmesi sırasında, örneğin tütsüleme veya fermantasyonda mikroorganizmaların ve enzimlerin etkisi sonucu meydana gelmektedirler (Silla-Santos 1996).

Gıdalarda biyojen aminlerin belirlenmesi toksik olmaları yanında bazı gıdalarda (örneğin balık ve ürünlerinde yüksek histamin ve tiramin miktarı) bozulma indikatörü

olarak kullanılmaları açısından önemli bulunmaktadır (Hernandez-Jover *et al*. 1997a,b, Aytac *et al*. 2000).

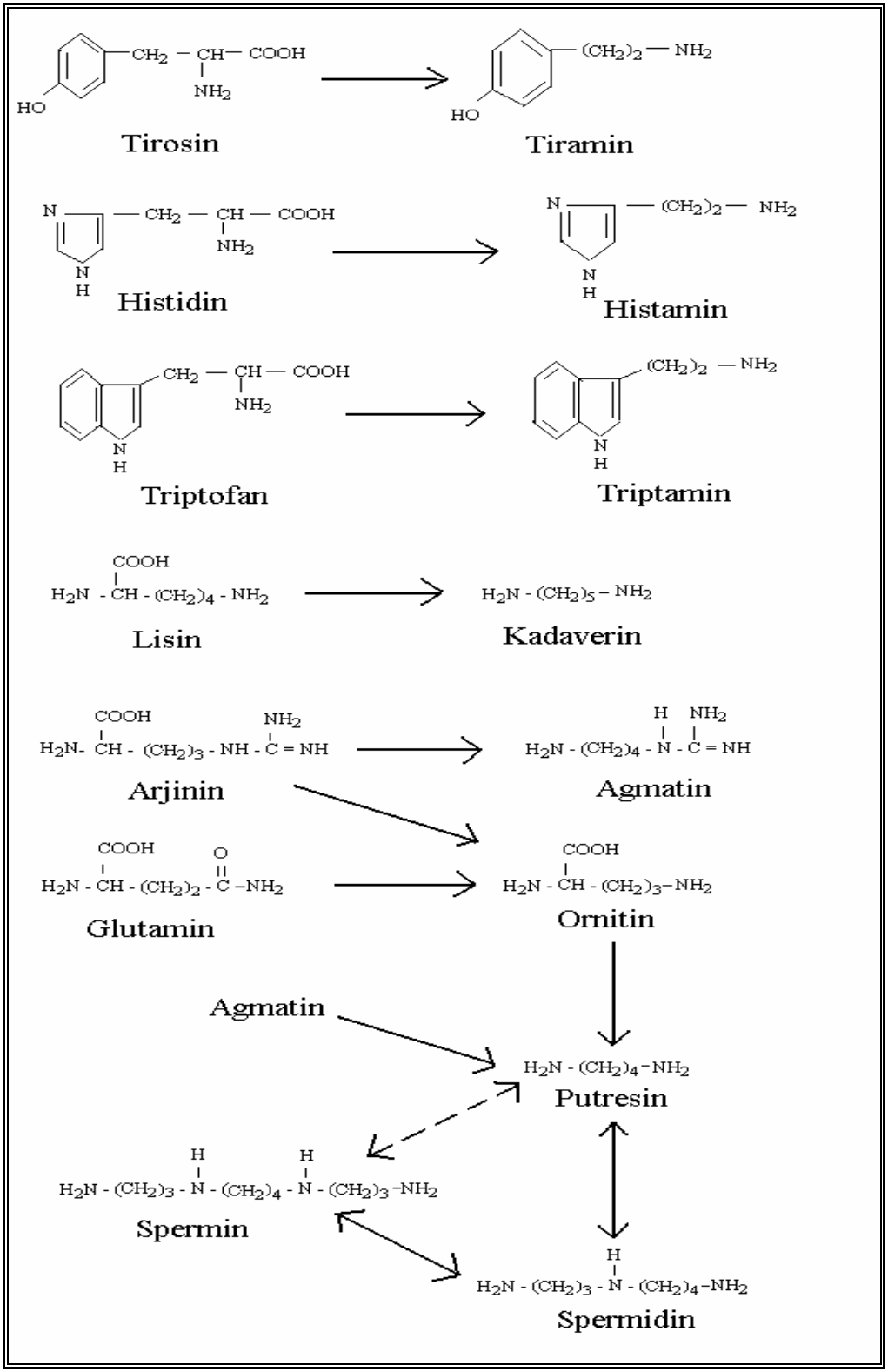
Ülkemizde fermente et ürünlerinden sucuk ve çeşitli peynirlerde biyojen amin miktarları konusunda yapılmış araştırmalar bulunmakla birlikte, Türk mutfağında kış mevsiminde yaygın olarak tüketilen ve fermente bir ürün olan turşuların üretim sürecinde biyojen amin oluşumu ve miktarlarının araştırılması ile ilgili bazı araştırmalar bulunmaktadır (Yücel vd. 2001, Ekici and Coşkun 2004, Akbaş 2006). Araştırmada hem doğal fermantasyon yoluyla hem de starter kültür kullanılarak turşu üretiminin yapılması ve fermantasyon süresince oluşan biyojen aminlerin miktarları ile kimyasal ve mikrobiyolojik değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle yapılacak olan çalışmanın sonuçları, tüketici sağlığı açısından önem taşımakla birlikte, pratikte turşu üretimi yapan firmalara yönelik bilgiler açısından da yararlı olacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyojen aminler, gıdalarda bazı spesifik amino asitlerin dekarboksilasyonuna veya aldehit ve ketonların transaminasyonuna bağlı olarak oluşan temel azotlu bileşiklerdir. Histidin, tirozin, triptofan ve fenilalaninden mono aminler olan histamin (HIS), tiramin (TRA), triptamin (TRP) ve feniletilamin (FEA) meydana gelirken, benzer şekilde ornitin ve lisinden diaminler olan putresin (PUT) ve kadaverin (KAD) oluşmaktadır. Poliaminlerden spermidin (SPD) ve spermin (SPM) ise putresinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (Halász *et al*. 1994, Moret and Conte 1996, Kalač *et al*. 2000a,b, Kalač 2006, Anonymous 2006).

Düşük moleküler ağırlığa sahip olan biyojen aminler, doğal biyolojik aktiviteleri nedeniyle pek çok gıdada bulunmaktadırlar. Bu gıdalar arasında balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri (Maijala *et al*. 1995a, Bodmer *et al*. 1999), yumurta, peynir gibi proteince zengin gıdalar, fermente sebzeler ve soyalı ürünler, bira ve şarap gibi alkollü içecekler (Shalaby 1996, Křížek and Pelikánová 1998), meyveler, fındık ve çikolata (Silla Santos 1996) gibi gıdalar yer almaktadır.

Gıdalarda biyojen amin oluşumu, hem dekarboksilaz enzim üretme yeteneği olan mikroorganizmaların varlığına hem de uygun kofaktör ve/veya bir indükleyici ile dekarboksilaz enzim sentezi için koşulların uygun olmasına ve ortamdaki amino asit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle yüksek miktarda biyojen amin oluşumunu kontrol altına alabilmek için, oluşumu etkileyen kritik faktörlerin mutlaka bilinmesi gerekmektedir (Maijala *et al*. 1995b).



Şekil 2.1 Biyojen amin oluşumu (Halász *et al*. 1994, Anonymous 2006)

Amino asit dekarboksilaz enzimi bakteriler arasında yaygın olmamakla birlikte; *Achromobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus* ve *Vibrio* cinsi pek çok bakteri bir veya daha fazla amino asidi dekarboksile etme yeteneğindedir (Sumner and Taylor 1989, ten Brink *et al*. 1990, Hwang *et al*. 1995, Silla Santos 1996). Birçok Enterobacteriaceae türü putresin ve/veya kadaverin üretme yeteneğine sahipken yalnızca birkaç *Lactobacillus* suşunun histidin dekarboksilaz enzimi pozitiftir (ten Brink *et al*. 1990).

Ayhan *et al*. (2000), 53 adet kıyma örneğinden izole edip tanımladıkları toplam 51 adet Enterobacteriaceae suşunu Triptik Soy Broth besiyerinde üreterek mL' deki mikroorganizma sayıları ile besiyerine kattıkları histidinin bakteriler tarafından kullanılması sonucu oluşan histamin düzeylerini HPLC tekniği ile belirlemişlerdir. Diğer yandan suşların modifiye Niven Agar besiyerinde histidin dekarboksilaz enzim aktivitelerini de incelemişlerdir. Sonuç olarak; mikroorganizma sayısı ile üretilen histamin düzeyi arasında bir korelasyon saptayamadıklarını, *Hafnia alvei* N27 suşunun besiyerindeki sayısının 9,56 log kob/mL düzeyine ulaştığı halde histidini en az indirgeyen suş olduğunu ifade etmişlerdir. Modifiye Niven ortamının histidin dekarboksilaz enzim üretiminin belirlenmesinde hatalı pozitif sonuçlar oluşturabildiği sonucuna varmışlardır.

Durlu *et al*. (2001) kıyma ve hamburgerlerden izole edilip tanımlanmış Enterobacteriaceae familyasına ait 44 adet suşun Brain Heart Infusion sıvı besiyerinde biyojen amin üretme yeteneklerini araştırdıkları çalışmalarında; *E. coli* EC04 suşunun 65,88 mg/100 mL ile en yüksek düzeyde histamin ürettiğini, ardından *E. coli* EC03 suşunun 45,48 mg/100 mL düzeyinde kadaverin ve *Citrobacter freundii* CF02' nin ise 50,04 mg/100 mL putresin üreticisi olduğunu saptamışlardır. Enterobacteriaceae familyasına mensup suşların ürettikleri esas biyojen aminlerin histamin, putresin ve kadaverin olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bilindiği gibi starter kültür kullanımı, kısa sürede standart kalitede bir gıda üretimini olanaklı kılmaktadır. Bu nedenle yapılan araştırmalarda gıda fermantasyonlarında kullanılan starter kültürlerin seçiminde sadece laktik asit üretiminin göz önünde tutulmaması, biyojen amin oluşturma yeteneklerinin de bilinmesinin gerekli olduğu vurgulanmaktadır (Straub *et al*. 1995, Halász *et al*. 1999).

Faeth ve Rodler (1994) hem çeşitli gıda maddelerinden izole ettikleri hem de kendi enstitülerindeki tüm laktik asit bakterilerinin sıvı kültürde oluşturdukları biyojen amin düzeylerini HPLC tekniği kullanarak incelemişler ve çoğu suşun düşük düzeyde histamin ürettiğini, ancak *Lactobacillus buchneri* B189 ve B190 numaralı suşlarının 49,7-41,3 mg/L gibi yüksek düzeyde histamin, yine *Streptococcus* B218' in de 408 mg/L düzeyinde tiramin oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Straub *et al*. (1995) çeşitli gıdalardan izole ettikleri 523 adet laktik asit bakterisinin biyojen amin oluşturma yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmada, izole edilen suşların putresin, kadaverin, histamin, tiramin ve feniletilamin oluşturma yeteneklerine bakılmış ve *Carnobacteria* spp., *Lactobacillus buchneri*, *L. curvatus* ve *L. reiteri*' nin yüksek düzeyde biyojen amin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Süt ürünleri, şarap ve lahana turşusunda yaygın olarak kullanılan bazı starter kültürlerin yüksek düzeyde biyojen amin oluşturduğunu, bu nedenle starter kültür seçiminde bu özelliklerin dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Aytaç vd. (1997), *Morganella morganii* ve *Proteus vulgaris* ile histamin oluşumuna etki eden bazı parametreleri inceledikleri çalışmalarında, örneklerdeki histamin miktarlarını kalorimetrik yöntemle spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir. Buna göre; Tripton Soya Histidin (TSH) sıvı besiyerinde *M. morganii*' nin optimum pH 5,0 ve % 4 NaCl konsantrasyonunda, *P. vulgaris*' in ise optimum pH 6,0 ve % 1 NaCl konsantrasyonunda maksimum düzeyde histamin ürettiklerini; her iki bakterinin de 30 ^{o}C' da ve 24 saatte en yüksek histamin üretimi (*M. morganii* için 291,21 µg/mL, *P. vulgaris* için 58,80 µg/mL) seviyesine ulaştıklarını bulmuşlardır.

Biyojen aminler vücutta protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluştururlar (Hornero-Méndez and Garrido-Fernández 1997). Putresin, spermin, spermidin gibi poliaminler canlı hücrelerin vazgeçilmez bileşenleridir. Ayrıca poliaminler, bağırsaklardaki immünolojik sistemde ve normal metabolik fonksiyonların aktivitesinin sürdürülmesinde de gereklidir (Silla Santos 1996). Gıdalardaki putresin ve poliaminlerin sınırlı miktarlarda alınması insan beslenmesinde olumlu bir rol oynamasına karşın, özellikle histamin ve tiramin gibi biyojen aminlerin ağız yoluyla aşırı miktarlarda alınması sonucunda mide bulantısı, kusma, aşırı yorgunluk, solunum güçlüğü, kalp çarpıntısı, baş ağrısı, baş dönmesi, hipotansiyon (histamin, putresin, kadaverin) veya hipertansiyon (tiramin), kurdeşen, beyin kanaması, anafilaktik şok sendromu ve ölüm meydana gelmektedir (Moret *et al*. 1992, Křížek and Pelikánová 1998, Lange *et al*. 2002, Erkmen and Bozkurt 2004, McCabe-Sellers *et al*. 2006).

Memelilerin intestinal bölgelerinde oldukça etkili detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Bu detoksifikasyon sisteminde mono amin oksidaz (MAO) ve di amin oksidaz (DAO) enzimleri önemli rol oynamaktadır (ten Brink *et al*. 1990, Špička *et al*. 2002). Detoksifikasyonun etkinliği bireyler arasında farklılık gösterebildiği gibi bazı antidepresan ilaçlar ve alkol gibi MAO-inhibitörlerinin vücuda alımından da etkilenmektedir. Stres, depresyon ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ağrı kesici ve diğer ilaçlar MAO-inhibitörleri içermektedir (Kalač *et al*. 2000a,b, Moret *et al*. 2005, McCabe-Sellers *et al*. 2006). Tiramin veya diğer aminleri içeren olgunlaşmış peynir, şarap, bira ve maya ekstraktlarıyla birlikte sauerkraut (susuz lahana turşusu), bakla ve avokado gibi sebze ve meyvelerin tüketimini takiben hipertansiyon krizlerinin görüldüğü ve 4 saatlik zaman dilimi içinde tiramin alımının 6 mg' ı geçmesinin hasta için tehlike oluşturduğu bildirilmektedir (Moret *et al*. 2005).

Biyojen aminlerin zararlı etkileri kişilerin fizyolojik yapısına, tolere edebildikleri konsantrasyona, ortamdaki biyojen aminlerin birbirleri ile interaksiyonuna ve MAO enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak değişmektedir (ten Brink *et al*. 1990). Feniletilamin, putresin ve kadaverin histamin detoksifikasyon enzimleri olan DAO ve HMT (histamin N-metiltransferaz) enzimlerinin her ikisini de inhibe ederken; tiramin MAO' ları, triptamin de DAO' ları inhibe etmektedir (Stratton *et al*. 1991).

Biyojen aminlerden kaynaklanan gıda kaynaklı intoksikasyonlar içinde en fazla rastlanan histaminozistir. Bireyler arasında detoksifikasyon mekanizması farklılık göstermekle birlikte gıdalarda en yüksek toksik limit 100 mg histamin/kg, alkollü içeceklerde ise 2 mg/L olarak rapor edilmiştir (ten Brink *et al*. 1990). Diğer biyojen aminlerin toksik dozları hakkında daha az veri bulunmakla birlikte eşik değerlerinin tiramin için 100-800 mg/kg, feniletilamin için 30 mg/kg ve toplam biyojen amin için 100-200 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Maijala and Eorola 1993, Nout 1994, Halász *et al*. 1999). Ayrıca, Stratton *et al*. (1991) tarafından putresin için belirlenen toksik limitin 396 mg/kg olduğu ileri sürülmüştür.

Gıdalarda biyojen aminlerin bulunuşu ve artışından kaçınılmasının bir nedeni de putresin, spermin ve spermidin gibi sekonder aminlerin nitrit ile birleşerek kanserojen nitrozaminlere dönüşmeleridir (ten Brink *et al*. 1990).

Ülkemiz de dahil olmak üzere pek çok ülkede fermente gıdalarda biyojen amin oluşumu ve miktarları üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Özellikle fermente et ürünlerinde (Maijala and Eerola 1993, Maijala *et al*. 1995a,b, Cantoni 1995, Hernandez-Jover *et al*. 1997a,b, Ayhan *et al*. 1999, Aytac *et al*. 2000, Komprda *et al*. 2001, Durlu-Özkaya *et al*. 2001, Cosansu and Ayhan 2002, Ansorena *et al*. 2002, Gonzalez-Fernandez *et al*. 2003, Bruna *et al*. 2003, Komprda *et al*. 2004, Erkmen and Bozkurt 2004, Bozkurt 2006) ve çeşitli peynirlerde (Schneller *et al*. 1997, Durlu-Özkaya *et al*. 1999, Durlu-Özkaya *et al*. 2000, Durlu-Özkaya 2001, Durlu-Özkaya 2002, Novella-Rodriguez *et al*. 2002, Gennaro *et al*. 2003, Novella-Rodriguez *et al*. 2003, Sagun *et al*. 2005) biyojen aminlerin oluşumu ve miktarının belirlenmesi üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda Elektrokinetik Kapiller Elektroforez, Biosensör ve HPLC gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

Fermente ürünler içinde yer alan ve yaygın olarak tüketilen turşuların üretim sürecinde biyojen amin oluşumunda yine hammadde, sıcaklık, pH, fermantasyon süresi, doğal flora veya katılan starter kültür gibi pek çok faktörün rol oynadığı açıktır.

1934' de Keil ve Kritter sauerkrautda (susuz lahana turşusu) putresin ve histamin bulunduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar lahanada serbest histidin içeriğini incelemişler ancak varlığını saptayamamışlardır. Sonuç olarak, histaminin histidin amino asidinin enzimatik reaksiyona uğraması sonucu meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir (Halász *et al*. 1999).

Mayer *et al*. (1973), 50 adet ticari sauerkraut örneğindeki histamin konsantrasyonlarını incelemişler ve bu konsantrasyonların 9-130 mg/kg arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Diğer bir çalışma Buckenhüskes *et al*. (1992) tarafından yapılmış ve araştırıcılar sauerkraut örneklerinde histamin konsantrasyonlarını 12-78 mg/kg olarak saptamışlardır. Baráth ve Halász (1991), 8 adet sauerkraut örneğinde hem sebze hem de salamurada histamin düzeylerini araştırmışlardır. Histamin konsantrasyonunun lahanada 42-52 mg/kg, salamurada ise daha yüksek konsantrasyonda (143-174 mg/kg) olduğunu belirlemişlerdir (Halász *et al*. 1999).

Taylor *et al*. (1978) çeşitli marketlerde satışa sunulan 50 adet sauerkraut örneğinin histamin içeriğini araştırmışlar ve 0,91-13,0 mg/100 g olarak belirledikleri histamin değerlerinin gıda zehirlenmelerine neden olan 1000 mg/kg seviyesinden düşük olduğu sonucuna varmışlardır (Ekici and Coskun 2004).

Kuensch *et al*. (1989) ticari olarak satışa sunulan sauerkraut örnekleri ile yaptıkları bir çalışmada, incelenen örneklerin tamamının önemli ölçüde (en yüksek 540 mg/kg) biyojen amin içerdiğini saptamışlardır.

Kuensch *et al*. (1990) sauerkraut fermantasyonunun başlangıç aşamasında putresin miktarının 150 mg/kg' dan daha fazla olduğunu ve fermantasyonun sonuna doğru histamin ve tiramin aminlerinin görüldüğünü bildirmişlerdir (Hornero-Méndez and Garrido-Fernández 1997).

Halász *et al*. (1999) starter kültür seçiminin sauerkraut fermantasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iki farklı starter kültürün biyojen amin üretim düzeyini

incelemişlerdir. MRS sıvı besiyerinde *Lactobacillus curvatus* 2775' in histamin sentezlemediğini ve ürettiği toplam amin değerinin de düşük çıktığını belirlemişlerdir. Starter kültür kullanımının lahana fermantasyonu süresince pH ve biyojen amin oluşumunun azalmasını olumlu yönde etkilediğini, *L. plantarum*' un düşük düzeyde amin üreticisi olduğunu ve belirlenebilir miktarda histidin dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre starter kültür olarak *L. plantarum* seçildiğinde 100 g lahana için 5.10^6-2.10^7 düzeyinde kullanılmasını, ancak *L. curvatus* için tiramin konsantrasyonunu artırmamak amacıyla daha düşük düzeyde kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Kalač *et al*. (1999) 121 adet sauerkraut örneğinde hücresel elektrokinetik kapiler kromotografi yöntemi ile biyojen aminleri belirlemişlerdir. Örnekler Çek üretimi, Avusturya üretimi, ev yapımı ve salamurasıyla birlikte kavanozda sterilize edilenler olmak üzere dört grup altında toplanmıştır. Tiramin, putresin ve kadaverin için en yüksek konsantrasyonlar, sırasıyla, 174, 146 ve 50 mg/kg olarak belirlenmiştir. Ev yapımı sauerkrautlarda ise çok düşük konsantrasyonlar belirlemişlerdir. Histamin seviyesinin örneklerin % 44' ünde 2 mg/kg' ın altında ve örneklerin yalnızca % 19' unun 10 mg/kg' ın üzerinde olduğunu; buna karşın triptamin (1,3 mg/kg) ve spermidinin (1,0 mg/kg) en düşük konsantrasyona sahip biyojen aminler olduğunu saptamışlardır.

Kalač *et al*. (2000a) 3 adet beyaz lahana çeşidini kullanarak, 3 farklı sauerkraut hazırlamışlardır. Başlangıçta 22 ^{o}C' da 14 gün fermantasyona bırakılan ve daha sonra 5-6 ^{o}C' da depolanan örnekleri 6 ay sonunda analiz etmişlerdir. Araştırmada starter katılmadan fermantasyona uğratılan kontrol örnekleri ile *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* ve hazırlanan karışık Microsil ticari laktik asit bakteri türleri (her birindeki doz 5.10^6 kob/g lahana) ile inokule edilen örnekler olmak üzere 6 farklı deneme kurulmuş ve örneklerdeki biyojen amin oluşumu hücresel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle incelenmiştir. Analiz sonucunda histamin, triptamin, spermidin ve spermin konsantrasyonlarını genellikle 10 mg/kg' ın altında bulmuşlardır. Tiramin, putresin ve kadaverin oluşumunun toplam konsantrasyonunu kontrol örneklerinde 450-780 mg/kg, *L. plantarum* kullanılan örneklerde 47,6-120 mg/kg, Microsil kullanılan örneklerde ise

41,1-205,7 mg/kg olarak belirlemişlerdir. *L. plantarum* ve Microsil' in bu oranların düşüşünde önemli rol oynadıklarını istatistiksel olarak da saptamışlardır.

Kalač *et al.* (2000b) yaptıkları diğer bir çalışmada 3 beyaz lahana çeşidi ile üretilmiş ürünlerinin depolanması sürecinde biyojen amin oluşumu ve amin konsantrasyonlarındaki değişimleri incelemişlerdir. Denemede turşuları 15 ^{o}C' da 14 gün süreyle doğal fermantasyona bıraktıktan sonra 5-6 ^{o}C' da depolamışlar ve 2, 4, 6 ve 12. ayın sonunda örnek almışlardır. Analiz sonuçlarına göre tiramini 100 mg/kg' ın üzerinde belirlemişler, ardından en yüksek değerler olarak putresin ve kadaverini saptamışlardır. Buna karşın, spermidin konsantrasyonunun 14 mg/kg' ın altında olduğunu, histamin, triptamin ve spermin konsantrasyonlarının ise teşhis limitlerine ulaşmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca tiramin konsantrasyonunun depolamayla önemli miktarda arttığını bildirmişlerdir.

García-García *et al.* (2001) yaptıkları çalışmalarında ticari olarak hazırlanan farklı sofralık zeytinlerin ve diğer turşuluk gıdaların biyojen amin içeriklerini saptamışlardır. Sofralık zeytin, kebere, kebere meyvesi ve hıyarlarda toplam biyojen amin miktarının meyvenin her 1 kg için 60 mg' dan daha az olduğunu; bu nedenle de sözü geçen ürünlerin insan sağlığı için bir risk oluşturmadığını ifade etmişlerdir. Yeşil zeytin ve salatalık örneklerinin hepsinde putresin bulunduğunu ancak 18 mg/kg' dan daha düşük seviyede olduğunu tespit etmişlerdir.

Yücel vd. (2001) HPLC yöntemini kullanarak geleneksel olarak üretilmiş salamuralı ve % 1 sitrik asitle pH' sı ayarlanmış salamuralı lahana turşularındaki biyojen amin oluşumlarını incelemişlerdir. % 6, 8 ,10 ve 12 düzeyinde tuz içeren turşulardan en yüksek biyojen amin miktarlarını % 10 tuz içeren örnekte saptamışlardır. Fermantasyonun 12. gününde % 6, 8 ve 10 düzeyinde tuz içeren sitrik asitli turşu örneklerinin sitrik asit içermeyenlere oranla daha az biyojen amin içerdiğini, % 12 tuz içeren asitli ve asitsiz örneklerde ise aynı ilişkinin görülmediğini tespit etmişlerdir. % 10 düzeyinde tuz içeren örnekte fermantasyonun 12. gününde 39,8 mg/kg putresin, 8,94 mg/kg kadaverin, 88,4 mg/kg triptamin, 219,3 mg/kg spermin, 9,40 mg/kg spermidin ve

0,64 mg/kg tiramin belirlerken, fermantasyonun 19. gününde ise 27,4 mg/kg putresin, 71,4 mg/kg kadaverin, 29,5 mg/kg triptamin, 5,67 mg/kg spermin ve 9,85 mg/kg tiramin tespit etmişlerdir. Sonuç olarak % 10 tuz konsantrasyonunda fermente olan, sitrik asit ilave edilmemiş lahana turşularının yüksek seviyede biyojen amin oluşumuna olanak sağladığını belirlemişlerdir.

Špička *et al*. (2002) hücresel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, hem doğal yolla hem de starter katarak ürettikleri sauerkrautlarda biyojen amin oluşumunu izlemişlerdir. Altı adet kıyılmış beyaz lahana çeşidinin 22 ºC' da 14 gün süren başlangıç fermantasyonu ile hazırladıkları lahana turşularını, 5-6 ºC' da depolamış ve 6. ay sonunda analiz etmişlerdir. Denemede starter kültür olarak *L. plantarum* (5.10^5 kob/g olacak şekilde) kullanmışlardır. Çalışmada alınan sonuçlara göre starter katkısının putresin, tiramin ve kadaverinin üretim miktarını önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Diğer yandan, spermidin içeriğinin 10 ile 30 mg/kg arasında değiştiğini ve spermidin miktarında starter kültürün herhangi bir azalmaya neden olmadığını; ancak triptamin, spermin ve histamin seviyelerinin azaldığını ve hatta teşhis limitlerinin altına indiğini saptamışlardır. Pratikteki uygulamalar için, araştırmada kullanılan *L. plantarum* suşunun en az 5.10^5 kob/g düzeyinde, sauerkraut fermantasyonları için kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Ekici ve Coşkun (2004) Van ilindeki marketlerden toplanan 50 adet sebze turşusu örneğinde (28 adet karışık, 6 adet kırmızı biber ve 7 adet hıyar turşusu) histamin içeriğini fluorometrik yöntem kullanarak incelemişlerdir. Tüm turşu örneklerinde histamin seviyesinin 16,54 mg/kg ile 74,91 mg/kg (ortalama 30,73 mg/kg) arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Hıyar turşusundaki histamin seviyesini minimum 26,66 mg/kg, maksimum 44,72 mg/kg (ortalama 34,73 mg/kg) olarak saptamışlardır.

Moret *et al*. (2005) HPLC yöntemi ile taze ve konserve sebzelerde serbest biyojen amin içeriğini araştırmışlardır. Sauerkraut dışındaki örneklerde putresin (0,2-0,5 mg/100 g taze ağırlık) ve spermidinin (0,4-4,5 mg/100 g taze ağırlık) en çok belirlenen aminler olduğunu ve genellikle bunları sperminin (maksimum 1,1 mg/100 g) takip ettiğini tespit

etmişlerdir. Konserve sauerkrautta tiramin seviyesinin 4,9 mg/100 g olduğunu, ancak diğer örneklerdeki tiramin seviyesinin 1,2 mg/100 g' ı geçmediğini saptamışlardır. Taze ıspanak örneklerinde ise 2,0 mg/100 g düzeyinde histamin belirlemişlerdir.

Akbaş (2006) HPLC yöntemini kullanarak yaptığı çalışmasında piyasadan temin ettiği toplam 100 adet pastörize ve pastörize edilmemiş olarak satılan çeşitli tipteki turşu ve 20 adet ev yapımı turşu örneğinin biyojen amin içeriğini araştırmıştır. Turşuların meyve ve/veya salamuralarında en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminleri, sırasıyla, putresin, kadaverin ve triptamin (sırasıyla ev yapımı örneklerde 63,60 mg/L, 23,48 mg/L, 7,00 mg/kg; ticari örneklerde ise 59,69 mg/L, 18,47 mg/L, 19,51 mg/kg), en düşük konsantrasyona sahip biyojen amini ise spermin (1,61 mg/L) olarak belirlemiştir. Ticari örneklerde en yüksek toplam biyojen amin miktarını 81,84 mg/L, ev yapımı örneklerde ise 86,25 mg/L olarak belirlemiştir. Sonuç olarak, incelenen tüm turşu örneklerinde toplam biyojen amin düzeylerinin literatürde verilen ve pek çok ülkede yasal olarak kabul gören toksik limitlerin altında bulunduğunu ifade etmiştir.

Günümüzde pek çok üründe biyojen aminlerin oluşumu ve miktarları ile değişik teknik ve farklı yöntemlerin kullanımı konusunda yapılan çalışmalar sürmektedir.

Özellikle son yıllarda gıdalarda biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla daha hassas ve hızlı tekniklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Eerola *et al.* (1993) sıvı kromotografi tekniği kullanarak kurutulmuş sosislerde yaptıkları çalışmada, biyojen aminin teşhis limitlerinin tiramin, spermin, spermidin ve kadaverin için 1 mg/kg, feniletilamin, putresin ve triptamin için 2 mg/kg ve serotonin için de 5 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, bu yöntemin kurutulmuş sosis örneklerindeki biyojen aminlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini ve aynı zamanda kıyma, peynir ve Tuna balığı gibi diğer gıdaların analizlerinde de uygulanabileceğini belirlemişlerdir.

Kirschbaum *et al.* (2000) HPLC ile biyojen aminlerin ön-kolon türevlendirmesi için 3,5-dinitrobenzoil klorür (DNBZ-Cl) ayıracını test ettikleri çalışmalarında teşhis limitlerini yaklaşık olarak 124-864 µg/L (enjeksiyon miktarı 203-1410 pg) belirlemişlerdir.

Kadaverin (0,976) ve serotonin (0,965) dışında belirleme katsayılarını 0,989-0,996 arasında bulmuşlardır. Bu yöntemi fermente lahana suyu, soya sosu, Miso (soya ezmesi), fermente balık sosu ve ançüez ezmesinde agmatin, kadaverin, histamin, oktopamin, 2-feniletilamin, putresin, serotonin, spermidin, spermin, triptamin ve tiramin miktarlarının belirlenmesinde uygulamışlardır. Tüm fermente lahana suyu örneklerinde 366 mg/L putresin, 39-63 mg/L histamin, 37-73 mg/L tiramin ve 9-97 mg/L spermidin tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu yöntemin, yüksek geri dönüşüm oranı ve doğrusal bir türevlendirme sağladığı için fermente ürünlerde biyojen amin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Shakila *et al*. (2001) balık ve balık ürünlerinde biyojen amin analizleri için ince tabaka kromotografi (TLC)–dansitometri ve yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) gibi kromotografi tekniklerinin uygunluğu üzerine karşılaştırmalı bir çalışma yapmışlardır. HPLC yönteminin daha doğrusal (5-100 ng), hassas ve tekrarlanabilir (< % 3) olmasının yanı sıra komplike aletler, teknik bilgi ve yüksek uygulama masrafları ile zaman gerektirdiğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan doğrusallık (20-300 ng) ve tekrarlanabilirlikte (< % 8) çok az bir kayıpla TLC–dansitometrinin hızlı ve HPLC yöntemine göre daha ucuz olduğunu ifade etmişlerdir.

Lange *et al*. (2002) çeşitli gıda örneklerinde biyojen aminlerin belirlenmesi için kapiler elektroforez (CE) yöntemi ile yüksek performanslı sıvı kromotografi yöntemini (HPLC) karşılaştırmışlardır. HPLC tekniği ile yürütülen çalışmada tiramin için teşhis limitlerinin 1,5 mg/kg ve CE tekniği ile yürütülen çalışmada ise 6 mg/kg olduğunu; putresin, spermidin, kadaverin, agmatin gibi diğer aminlerin de HPLC yöntemi ile 1,0-8,5 mg/kg arasında sıralandığını belirlemişlerdir. Sonuçta CE ve HPLC arasında iyi bir korelasyon olduğunu saptamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırmada piyasadan temin edilen Kornişon çeşidi turşuluk hıyarlar kullanılmıştır. Çalışmada starter katkılı örnekler için kullanılan *Lactobacillus plantarum* 11B suşu Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK' ten temin edilmiştir. Salamura hazırlamada Hıyar Turşusu Standardı TS 11112' ye (Anonim 1993) uygun tuz ve su, $CaCl_2.2H_2O$ (Merck), glasiyel asetik asit (% 99,9, Merck) kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri 1 litre hacimli, kapaklı cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyolojik sayımlarda enterobakteri ve koliform grubu bakterilerin sayımı için, sırasıyla, Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck) ve Violet Red Bile Agar (VRB, Merck) besiyerleri, toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyeri, laktik asit bakterilerinin sayımı için Man Rogosa Sharpe Agar (MRS, Merck) besiyeri ve maya-küf sayısını belirlemek için Patato Dextrose Agar (PDA, Oxoid) besiyeri kullanılmıştır.

Biyojen amin analizleri için gerekli olan tiramin (TRA), putresin (PUT), kadaverin (KAD), triptamin (TRP), feniletilamin (FEA), histamin (HIS), spermin (SPM) ve spermidin (SPD) biyojen aminleri Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)' den sağlanmıştır.

3.2 Yöntem

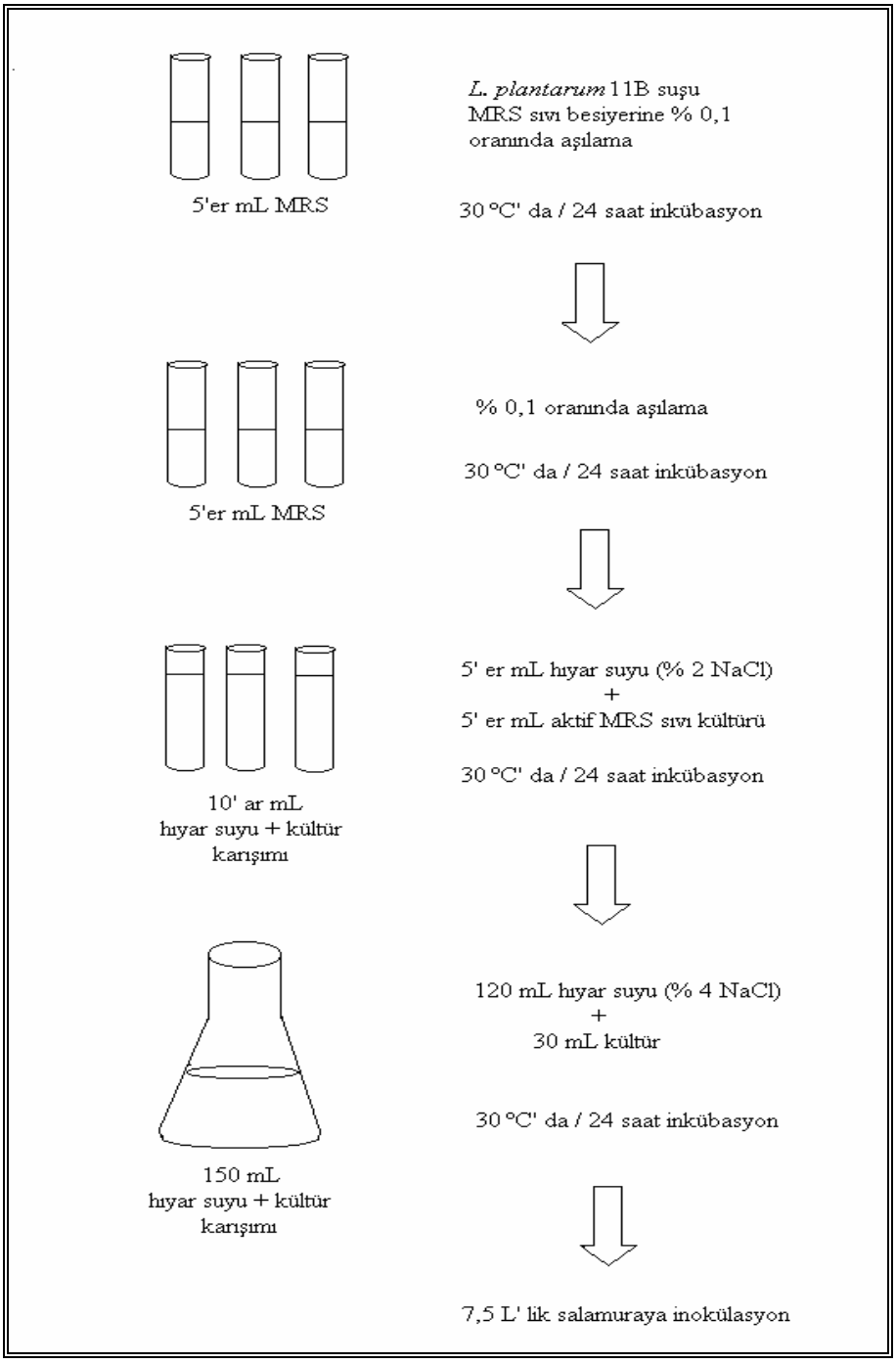
3.2.1 Turşuluk hıyarların hazırlanması

Deneme kurulacağı gün pazardan satın alınarak laboratuvara getirilen hıyarlar bekletilmeden aynı gün kullanılmıştır. Mümkün olduğunca eşit büyüklükte seçilen hıyarlar toz, toprak ve yabancı maddeler gibi kaba pisliklerinin uzaklaştırılması amacıyla musluk suyu ile yıkanmıştır.

3.2.2 Starter kültür hazırlanması

Starter kültür hazırlanmasında MRS sıvı besiyeri ve hıyar suyu kullanılmıştır. Hıyar suyu elde etmek için; kabukları soyulmuş hıyarlar blender yardımıyla parçalanmış ve süzgeçten geçirilerek posası ayrılmıştır. % 2 ve % 4 oranlarında NaCl ilave edilen hıyar suları 121 ^{o}C' da 15 dakika süreyle sterilize edilmişlerdir.

Lactobacillus plantarum 11B suşu, denemenin kurulmasından 4 gün önce, içerisinde 5 mL MRS sıvı besiyeri bulunan 3 tüpe aşılanmış ve 30 ^{o}C' da 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. İnkübasyonun ardından 5'er mL'lik MRS sıvı besiyerinde geliştirilen aktif *L. plantarum* 11B kültürleri içinde % 2 NaCl bulunan 3 tüpteki 5' er mL' lik hıyar sularına aktarılmıştır. Tekrar 30 ^{o}C' da 24 saat inkübasyon sonrasında 3 tüp içeriği (toplam 30 mL), % 4 NaCl içeren 120 mL hıyar suyu bulunan 250 mL' lik Erlenmayer' e aktarılmış ve 30 ^{o}C' da 24 saat süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.1). Bu şekilde starter kültür kademeli olarak tuza alıştırılmış ve fermantasyon ortamına daha çabuk adapte olması sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 3.1 *Lactobacillus plantarum* 11B suşunun aktifleştirilmesi ve hıyar suyuna adaptasyonunun aşamaları

Saf kültürün tuzlu hıyar suyuna adaptasyonu sırasında her aşamada (saf kültür, % 2 ve % 4 tuzlu hıyar suyu) MRS Agar besiyerine yayma kültürel sayım yöntemine göre ekim

yapılmıştır. Petriler, 28-30 ^{o}C' da 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır. Böylece hem starter kültürün fermantasyon ortamına adaptasyonu izlenmiş hem de salamuraya ilave edilen kültür miktarı belirlenmiştir.

3.2.3 Salamuranın hazırlanması

Salamuranın hazırlanmasında kullanılan musluk suyu, klorun uzaklaştırılması amacıyla kaynatılıp soğutulmuştur. Denge anında % 4 tuz konsantrasyonunu sağlamak amacıyla % 8 tuz, % 0,4 $CaCl_2$ ve % 0,4 glasiyel asetik asit içeren 7,5 litrelik iki ayrı salamura hazırlanmıştır. Salamuralardan birine 3.2.2.' de anlatıldığı şekilde hazırlanan kültürden, starter kültür oranı % 2 olacak şekilde 150 mL ilave edilmiştir. Diğer salamura bidonu kontrol olarak seçilmiştir. 1 L hacimli cam kavanozlara yaklaşık 500' er g hıyar konulmuş ve üzerleri hazırlanan salamuralarla tamamlanmıştır (hıyar : salamura oranı 1:1). Daha sonra turşu kavanozları oda sıcaklığında fermantasyona bırakılmıştır. Deneme 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4 Fermantasyonun izlenmesi

Üç tekerrürlü yapılan fermantasyon denemeleri oda sıcaklığında (20 ± 2 ^{o}C) yürütülmüştür. Starter katkılı örneklerin hazırlanmasında çizelge 3.1' de belirtilen günler için 11 adet kavanoz (2 adet kavanoz yedek), kontrol örneklerinin hazırlanmasında ise çizelge 3.2' de belirtilen günler için 13 adet kavanoz (2 adet kavanoz yedek) turşu kurulmuştur.

Denemede aseptik koşulların korunmasına özen gösterilerek alınan hıyar dokusu ve salamura örneklerinde yapılan analizlerle, starterli örnekler için 12 ve kontrol örnekleri için 30 günlük deneme süresi içerisinde ortaya çıkan kimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler çizelge 3.1 ve çizelge 3.2' de verilen planlarda gösterildiği şekilde izlenmiştir.

Çizelge 3.1 Starter katkılı örneklere ait analiz planı

Analiz günleri	pH	Titrasyon asitliği	Tuz	Mikrobiyolojik analizler	Biyojen amin analizleri
0.	+	+	+	+	+/*
1.	+			+	+/*
2.	+	+		+	+/*
3.	+		+	+	+/*
4.	+	+		+	+/*
6.	+		+	+	+/*
8.	+	+		+	+/*
10.	+			+	+/*
12.	+	+	+	+	+/*

+ : Salamurada yapılan analizler
* : Hıyar dokusunda yapılan analizler

Çizelge 3.2 Kontrol örneklerine ait analiz planı

Analiz günleri	pH	Titrasyon asitliği	Tuz	Mikrobiyolojik analizler	Biyojen amin analizleri
0.	+	+	+	+	+/*
1.	+			+	+/*
2.	+	+		+	+/*
3.	+		+	+	+/*
4.	+	+		+	+/*
6.	+		+	+	+/*
8.	+	+		+	+/*
11.	+			+	+/*
16.	+	+		+	+/*
22.	+			+	+/*
30.	+	+	+	+	+/*

+ : Salamurada yapılan analizler
* : Hıyar dokusunda yapılan analizler

3.2.5 Kimyasal analizler

Salamura örneklerinde pH, tuz ve titrasyon asitliği analizleri TS 11112' ye (Anonim 1993) göre yapılmıştır.

3.2.5.1 pH

Salamura örneklerinde pH tayini için NEL pH 890 dijital tip pH metre kullanılmıştır.

3.2.5.2 Tuz

Çizelge 3.1 ve 3.2' de verilen analiz planlarına göre kontrol ve starter ilaveli örneklerin 0, 3 ve 6. günleri ile kontrolde 30., starterli örneklerde 12. günde her bir kavanozdan alınan 1 mL salamura örneği 100 mL' lik Erlenmayer' e aktarılmıştır. Erlenmayer' in içine teflon kaplı karıştırıcı çubuk atılmış ve manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuştur. Örneğin üzerine 25 mL destile su ilave edilerek seyreltme işlemi yapılmıştır. 1-2 damla metil oranj (% 0,1) indikatörü damlatıldıktan sonra, örneğin nötralizasyonu amacıyla, sarı renk oluşana kadar (1-3 damla) 1 N NaOH eklenmiştir. Daha sonra 2 mL % 5' lik K_2CrO_4 ilave edilerek 1 N $AgNO_3$ ile sabit kiremit kırmızı renk oluşuncaya kadar titrasyon yapılmıştır. Sonuçlar % tuz miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.3 Titrasyon asitliği

Titrasyon asitliği tayini için starter katkılı ve kontrol örneklerinden 0, 2, 4 ve 8. günler ile starterli örneklerde 12. günde, kontrol örneklerinde 16 ve 30. günlerde örnek alınmıştır. Alınan 10 mL salamura örneği 100 mL' lik Erlenmayer' e aktarılmıştır. Örnek 40 mL destile su ile seyreltilmiş ve manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuştur. Üzerine 1-2 damla fenol fitalein (% 1) indikatörü ilave edildikten sonra 0,1 N NaOH çözeltisi ile pembe renk oluşana kadar titre edilmiş ve sonuçlar % laktik asit olarak hesaplanmıştır.

3.2.6 HPLC analizi

3.2.6.1 HPLC cihazı

Araştırmada kullanılan HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları çizelge 3.3' te verilmiştir.

Çizelge 3.3 HPLC cihazının özellikleri ve biyojen amin analizi için kromatografi koşulları

HPLC	**Thermo Finnigan, Surveyor (Waltham, USA)**
Kolon fırını	Thermo Finnigan, Surveyor, Sıcaklık 5 ºC
Kolon	C-18 (250x4.6 mm, ID) Phenomenex Luna
Pompa	Surveyor dörtlü düşük basınç gradient pompa
Degasser	Otomatik vakum degasser
Dedektör	254 nm, PDA (Photo Diode Array), pik saflığının kontrolü için 195-500 nm arasında spektrum taramalı, bant genişliği: 2 nm
Yazılım programı	Chrom Quest Chromatography Software
Mobil faz	Solvent A: 30 mL buffer / 550 mL asetonitril / 420 mL destile su Solvent B: 2 mL buffer / 900 mL asetonitril / 100 mL destile su
Akış hızı	1,3 mL/dak.
Enjeksiyon	25 µL

Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan HPLC sistemi (Ankara Üniversitesi BİTAUM)

3.2.6.2 Biyojen amin standart çözeltilerinin hazırlanması

Tiramin (TRA), putresin (PUT), kadaverin (KAD), triptamin (TRP), feniletilamin (FEA), histamin (HIS), spermin (SPM) ve spermidin (SPD) 50 mL' lik balon jojeler içinde 0,4 M perklorik asit ile çözündürülmüş ve her bir biyojen aminin son konsantrasyonu 10 mg/50 mL olacak şekilde biyojen amin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Miks standart çözeltisi hazırlamak için ise her bir biyojen aminin 5 mL stok çözeltisi 50 mL lik balon jojeye aktarılmış ve hacim 0,4 M perklorik asit ile 50 mL' ye tamamlanmıştır. Dansil klorür çözeltisi için 10 mg dansil klorür 1 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır (Bütikofer *et al*. 1990).

3.2.6.3 Mobil faz

0,1 M tris, 0,1 M asetik asit ve destile su, sırasıyla, 2 / 1 / 2 oranında kullanılarak buffer (pH 8) hazırlanmıştır. Solvent A için 30 mL buffer / 550 mL asetonitril / 420 mL destile su ve Solvent B için de 2 mL buffer / 900 mL asetonitril / 100 mL destile su kullanılmıştır.

3.2.6.4 Örneklerin hazırlanması ve ekstraksiyonu

Çizelge 3.1 ve çizelge 3.2' de verildiği gibi fermantasyonun belirli günlerinde turşu örneklerinin salamuralarından 10' ar mL, el rendesinden geçirilerek küçük parçalara ayrıldıktan sonra elde edilen meyve kısımlarından ise 10' ar gram örnek alınmıştır. Alınan örnekler 250 mL' lik Erlenmayer' e konularak üzerlerine 200 µL 1-7 diaminoheptan (iç standart, Sigma) ve 25 mL perklorik asit ilave edilmiş, 20 dakika süreyle elle çalkalanmıştır. Bu şekilde hazırlanan karışım kaba filtre kağıdından geçirilerek 50 mL' lik balon jojelere süzülmüştür. Elde edilen süzüntünün üzeri % 5' lik triklor asetik asit (TCA) ile 50 mL' ye tamamlanmıştır.

3.2.6.5 Ekstraktların türevlendirilmesi

3.2.6.4' te açıklandığı şekilde hazırlanan örnek ekstraktlarından 400 µL alınarak alüminyum folyo ile sarılmış olan 10 mL' lik kapaklı santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 400 µL sodyum karbonat çözeltisi ilave edildikten sonra tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışımların üzerine 400 µL dansil klorür ilave edilip tekrar karıştırıldıktan sonra 30 dakika süreyle 40 ^{o}C' lık su banyosunda bekletilmiştir. Kalan dansil klorürü uzaklaştırmak için 200 µL sodyum glutamat eklenmiş ve karışım 60 dakika süreyle 40 ^{o}C' lık su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosunda bekletme sürecinde tüpler 15 dakika aralıkla tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu sürenin bitiminde 1 mL asetonitril ilave edilerek örnekler 3500 devirde 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar ependorf tüplerine alınarak HPLC analizi için –20 ^{o}C' da muhafaza edilmişlerdir (Eerola *et al*. 1993).

3.2.6.6 Starter kültürün biyojen amin üretme yeteneğinin kontrolü

Lactobacillus plantarum 11B suşu, MRS sıvı besiyerinde 30 ^{o}C' da 24 saat süreyle iki kez aktifleştirilmiştir. İçlerinde % 1 oranında histidin, tirozin, triptofan, fenilalanin, lisin, ornitin ve glutamat amino asitleri bulunan 10 mL' lik 7 adet MRS sıvı besiyeri içeren tüpe aktif kültürden inokülasyon yapılmış ve 24 saat süre ile 30 ^{o}C' da inkübasyona bırakılmıştır. İşlem bir kez daha tekrar edilmiştir. 48 saat sonunda her tüpten 5' er mL alınmış (toplam 35 mL) ve 100 mL' lik Erlenmayer' e aktarılmıştır. Elde edilen karışımdan santrifüj tüpüne 1 mL alınarak üzeri 0,4 M perklorik asitle 10 mL' ye tamamlanmış ve 3500 devirde 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 200 ve 400 µL alınarak 3.2.6.5' te anlatıldığı gibi türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme sonunda ependorf tüpleri HPLC analizi için –20 ^{o}C' da muhafaza edilmişlerdir.

3.2.7 Mikrobiyolojik analizler

Çizelge 3.2 ve çizelge 3.3' te gösterildiği gibi fermantasyonun belirli günlerinde ve steril koşullarda salamuralardan alınan 1 mL örnek, % 0,85' lik steril serum fizyolojikte 1 : 9 oranında seyreltilmiş ve elde edilen seyreltikler toplam mezofilik aerobik bakteriler, laktik asit bakterileri, Enterobakteri, koliform grubu bakteriler ve maya-küf sayımları için kullanılmıştır.

3.2.7.1 Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerine yayma kültürel sayım yöntemine göre ekim yapılmış ve 28-30 ^{o}C' da 48 saat süre ile inkübasyon sonucunda gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar logaritmik değerlere çevrilmiş ve log kob (koloni oluşturan birim) / mL olarak ifade edilmiştir (Anonymous 1996).

3.2.7.2 Laktik asit bakteri sayımı

Laktik asit bakteri sayımı için MRS Agar (de Man Rogosa Sharpe Agar, Merck) besiyeri kullanılmıştır. Yayma kültürel sayım yöntemine göre ekim yapılan petriler, 28-30 ^{o}C' da 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak verilmiştir (Anonymous 1996).

3.2.7.3 Enterobakteri sayımı

Enterobakteri sayımı, yayma kültürel sayım yöntemine göre Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck) besiyerinde yapılmıştır. Ekim yapılan petrilerde 37 ^{o}C' da 24 saat sonunda, gelişme olmayan petrilerde ise 48 saat sonunda gelişen pembe-kırmızı renkteki koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak verilmiştir (Anonymous 1996).

3.2.7.4 Koliform grubu bakterilerin sayımı

Violet Red Bile Agar (VRB, Merck) besiyeri koliform grubu bakterilerin sayımı için kullanılmıştır. Yayma kültürel sayım yöntemi ile ekim yapılan petrilerde 37 ^{o}C' da 24 saat sonunda, gelişme olmayan petrilerde ise 48 saat sonunda gelişen pembe-kırmızı renkteki koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak verilmiştir (Anonymous 1996).

3.2.7.5 Maya-küf sayımı

Toplam maya-küf sayımı Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid) besiyeri kullanılarak yayma kültürel sayım yöntemine göre yapılmıştır. Besiyerinin pH' sını 3,5' e ayarlamak amacıyla besiyeri içerisine % 10' luk tartarik asit çözeltisinden 1,6 mL / 100 mL ilave edilmiştir. Petriler, mayalar için 28-30 ^{o}C' da 72 saat, küfler için ise 28-30 ^{o}C' da 5 gün inkübasyona bırakılmış ve daha sonra gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak verilmiştir (Anonymous 1990).

3.2.8 İstatistiksel değerlendirme

Araştırmada mikrobiyolojik, kimyasal ve biyojen amin analiz sonuçlarına ilişkin verilerin SPSS (sürüm 14) programı ile analiz edilmiş, günler arasındaki farklılık ise Duncan testi ile saptanmıştır (Düzgüneş vd. 1987).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Starter Kültürün Salamuraya Adaptasyonu

3.2.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanan *Lactobacillus plantarum* 11B starter kültürünün fermantasyon ortamına adaptasyonunun izlenmesi amacıyla saf kültürden ve % 2 ve % 4 tuzlu hıyar sularından MRS agar besiyerine yayma kültürel sayım yöntemine göre ekimi yapılmıştır. 30 ^{o}C' da 48 saat süre ile inkübasyon sonunda elde edilen sayım sonuçları çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Starter kültür adaptasyonu (log kob/mL)

	I. Tekerrür	II. Tekerrür	III. Tekerrür
L. plantarum 11B	9,38	9,34	8,71
% 2 tuzlu hıyar suyu	9,51	9,43	9,20
% 4 tuzlu hıyar suyu	9,49	8,66	8,79

L. plantarum 11B suşunun fermantasyon ortamına adaptasyonundan sonra her bir tekerrürde salamuraya ilave edilen starter kültür miktarları, sırasıyla, 9,49, 8,66 ve 8,79 log kob/mL olarak bulunmuştur.

4.2 Kimyasal Analiz Sonuçları

Denemede starter ilave edilerek üretilen hıyar turşuları 12 gün, doğal fermantasyona bırakılarak üretilen kontrol örnekleri ise 30 gün süreyle fermantasyona bırakılmıştır. Bu süreler içinde belirli günlerde pH, % titrasyon asitliği ve % tuz miktarının belirlenmesi amacıyla kimyasal analizler yapılmıştır (Çizelge 4.2).

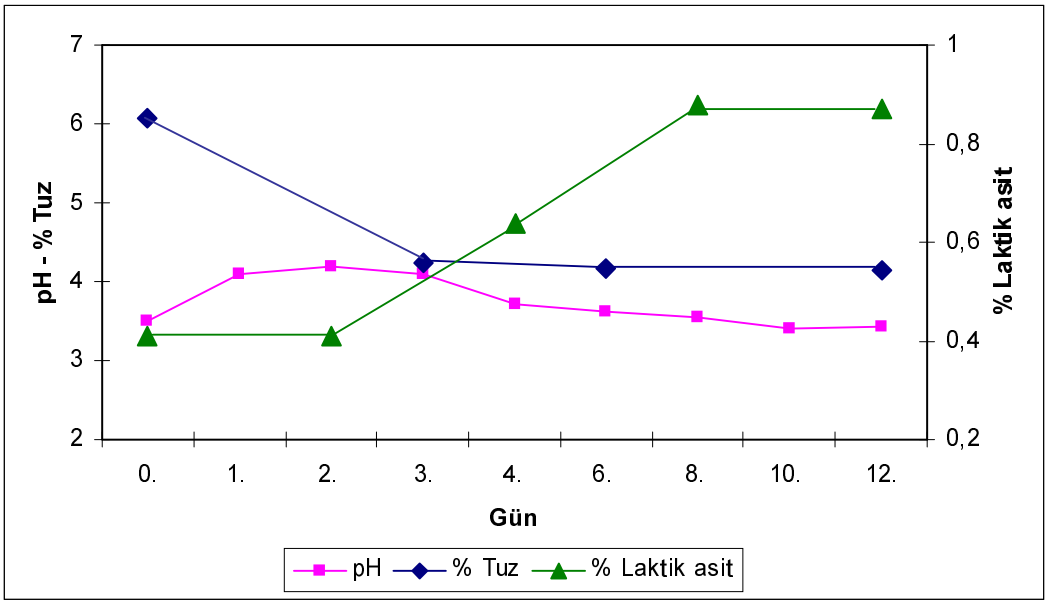
Fermantasyon esnasında laktik asit fermantasyonu nedeniyle titrasyon asitliğinde artış, asit oluşumuna paralel olarak da pH' da azalma ve tuz miktarının dengeye ulaşmasıyla

birlikte başlangıçta % 8 olan tuz konsantrasyonunun yarıya düşmesi beklenmektedir (İç 2000, Özçelik ve Ulu 2002). Denemede benzer sonuçlar elde edilmiş olup sonuçlar 3 tekerrürün ortalaması olarak çizelge 4.2, şekil 4.1 ve şekil 4.2' de verilmiştir. Buna göre, başlangıç tuz konsantrasyonu % 8, $CaCl_2$ konsantrasyonu % 0,4 ve asetik asit konsantrasyonu % 0,4 olan starter katkısız kontrol örnekleri ile starter ilave edilen örneklere ait salamuralara hıyarların konmasıyla birlikte hızlı bir besin ve madde alış verişi başlamıştır. Buna göre her iki grupta da hıyarların üzerinde doğal olarak bulunan laktik asit bakterileri ve kullanılan starter kültürün etkisiyle titrasyon asitliği değerlerinin arttığı anlaşılmıştır (Çizelge 4.2).

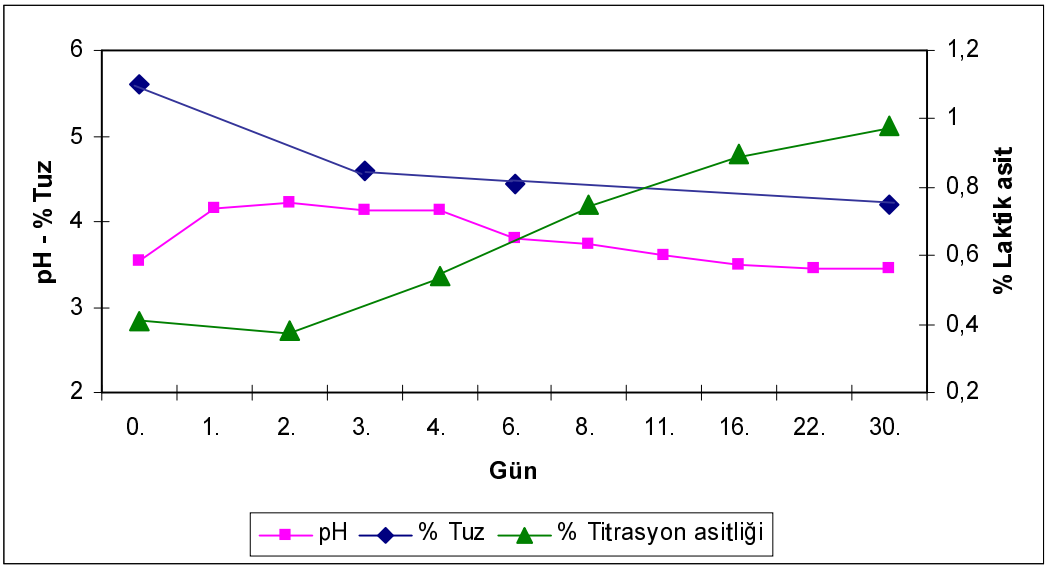
Çizelge 4.2 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşusundaki kimyasal değişimler

Gün	pH		Titrasyon asitliği (% Laktik asit)		TUZ (%)	
	Starter	Kontrol	Starter	Kontrol	Starter	Kontrol
0.	3,51 d	3,53 d	0,41 c	0,41 c	6,06 a	5,61 a
1.	4,10 ab	4,15 ab				
2.	4,18 a	4,22 a	0,41 c	0,38 c		
3.	4,10 ab	4,14 ab			4,24 b	4,59 b
4.	3,72 bc	4,13 bc	0,64 b	0,54 b		
6.	3,63 cd	3,80 cd			4,17 b	4,43 b
8.	3,54 d	3,73 d	0,88 a	0,75 a		
10.*/11.**	3,40 d	3,61 d				
12.*/16.**	3,43	3,50	0,87	0,90	4,15	
22.		3,45				
30.		3,45		0,98		4,20

(n=6)
* Starter
**Kontrol
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,01$).



Şekil 4.1 Starter ilave edilen örneklerde fermantasyon süresince pH, titrasyon asitliği ve tuz konsantrasyonunda görülen değişimler



Şekil 4.2 Kontrol örneklerinde fermantasyon süresince pH, titrasyon asitliği ve tuz konsantrasyonunda görülen değişimler

Starter katkılı ve kontrol örneklerinin salamuralarında fermantasyonun başlangıcında pH değerleri, sırasıyla, 3,51 ve 3,53 olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun ilk 2 gününde pH' nın, yine sırasıyla, 4,18 ve 4,22' ye kadar yükselmesinin nedeninin ise hıyarlardaki hücre özsuyunun salamuraya geçmesi olduğu düşünülmektedir.

Fermantasyon sırasında artan pH değerlerinin, starter katkılı ve starter katkısız kontrol örneklerinde 4. günden itibaren azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Starterli örneklerde en yüksek pH değeri 4,18 olarak fermantasyonun 2. gününde, en düşük pH değeri ise 3,40 olarak fermantasyonun 10. gününde belirlenmiştir. Kontrol örneklerinde ise en yüksek pH değeri 4,22 ile 2. günde görülürken, en düşük pH değeri de 3,45 ile 22. günde saptanmıştır.

pH bakımından yapılan varyans analizi sonucunda starter ilave edilen ve doğal fermantasyona bırakılan örnekler arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak günlere göre meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0,01$).

Araştırmamızda starter kültür kullanılarak üretilen örneklerden elde edilen pH değeri, hıyar turşusuyla yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında; Rodrigo *et al*. (1992)' un fermantasyon denemesinin son günü olan 27. günde belirlediği pH 3,54, yine benzer olarak yapılan Fleming *et al*. (1995)' un 30 günlük fermantasyon çalışmasının 10. günde pH 3,70 ve Özçelik vd. (2001)' nin 10 gün süren fermantasyonun 5. günde pH 3,84-4,00 olarak belirledikleri değerlerden düşük bulunmuştur. Fleming *et al*. (1973a)' un 21 günlük fermantasyonun 13. gününde pH 3,38, McDonald *et al*. (1991)' un 5 günlük fermantasyonun sonunda pH 3,42 ve Özçelik vd. (1998)' nin fermantasyonun son günü olan 13. günde pH 3,40 olarak belirlediği değerlerle benzer olduğu saptanmıştır. Ayrıca Fleming *et al*. (1973b)' un 36 gün süren fermantasyonun 13. gününde pH 3,15 ve Ulu (2001)' nun fermantasyon sonu olan 12. günde pH 3,20 olarak belirlediği değerlerden ise yüksek olduğu anlaşılmıştır. Sözü geçen tüm çalışmalarda tampon kullanılmıştır.

Starter kültür ilave edilmeden yürütülen araştırmalarla, denemeden elde edilen pH değerleri karşılaştırıldığında ise İç (2000)' in 30 gün süren fermantasyon sonunda pH 3,31-3,43 olarak belirlediği değerlerle benzerlik gösterdiği; Ogabi ve Pamir (1973)' in fermantasyonun sonu olan 30. günde belirlediği pH 3,90 ve Çalış ve Akbulut (1993)' un 60 gün süren fermantasyonun 23. günde bulduğu pH 3,56 değerinden ise düşük olduğu saptanmıştır.

Denemede en yüksek titrasyon asitliği değerlerine starterli örneklerde % 0,88 ile 8. günde, kontrol örneklerinde ise % 90 ile 16. ve % 0,98 ile 30. günde ulaşılmıştır. Yapılan istatistik analiz sonucunda starter ilave edilen örnekler ve kontrol örnekleri arasında titrasyon asitliği bakımından farklılık gözlenmemiş, ancak günlere göre meydana gelen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

Araştırmada, starter kültür ilave edilerek üretilen hıyar turşularından elde edilen titrasyon asitliği değerleri yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında; Fleming *et al.* (1995)' un 10. günde % 0,88 ve Özçelik vd. (1998)' nin 13. günde % 0,88 değerleri ile benzerlik gösterirken; Fleming *et al.* (1973a)' un 13. günde % 0,99, Fleming *et al.* (1973b)' un 13. günde % 1,02 ve Ulu (2001)' nun 12. günde % 1,04 olarak elde ettiği titrasyon asitliği değerlerinden düşük bulunmuştur. Starter kültür kullanılmadan üretilen kontrol örnekleri ile yapılan araştırmalar karşılaştırıldığında ise; Ogabi ve Pamir (1973)' in fermantasyonun 8-10. gününde % 0,63-1, İç (2000)' in 29. günde ortalama % 0,78-0,92 ve Şahin ve Akbaş (2001)' ın 3 haftalık fermantasyon sonunda % 0,80-1,04 olarak belirledikleri titrasyon asitliği değerleri ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Denemenin başlangıcında % 8 olan tuz konsantrasyonu, fermantasyonun ilk 3 gününde hızlı bir şekilde azalmış ve fermantasyonun sonunda starter kullanılan örneklerde % 4,15' e, kontrol örneklerinde ise % 4,20 düzeyine ulaşmıştır (Çizelge 4.2). Kontrol ve starter katkılı olan örnekler arasında bir fark gözlenmezken, günler arasında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

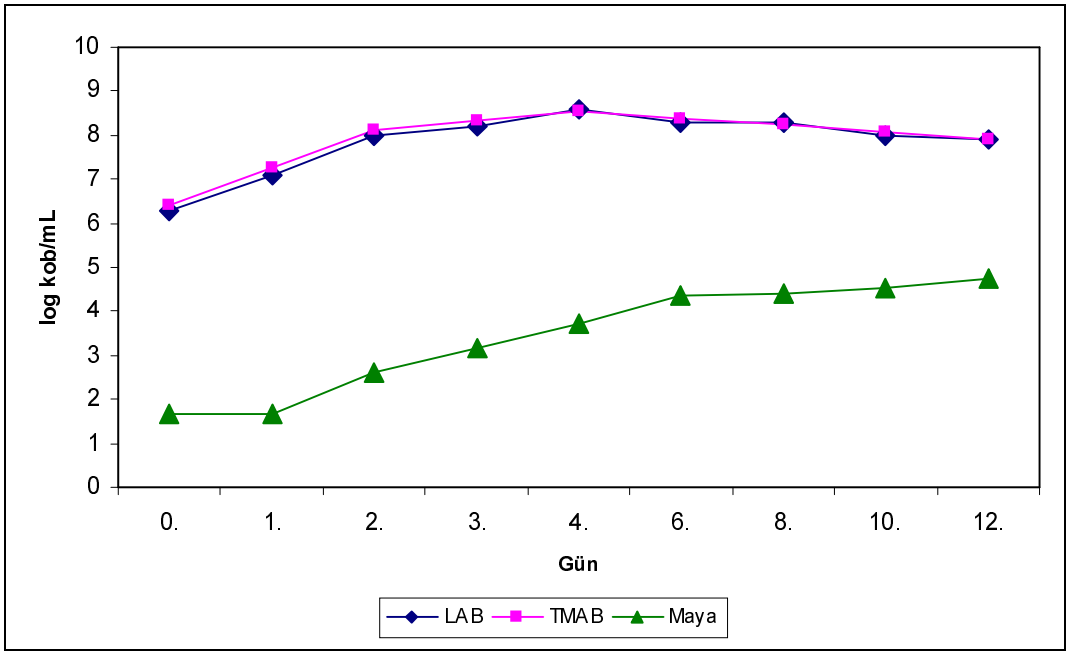
4.3 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Mikrobiyel gelişme, fermantasyonun belli günlerinde (starter katılarak üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerinde; doğal fermantasyonla üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 16, 22 ve 30. günlerinde) laktik asit bakterileri (LAB), toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), koliform grubu bakteriler, enterobakteri ve toplam maya-küf sayımları yapılarak belirlenmiş olup sonuçlar çizelge 4.3, şekil 4.3 ve şekil 4.4' te gösterilmiştir.

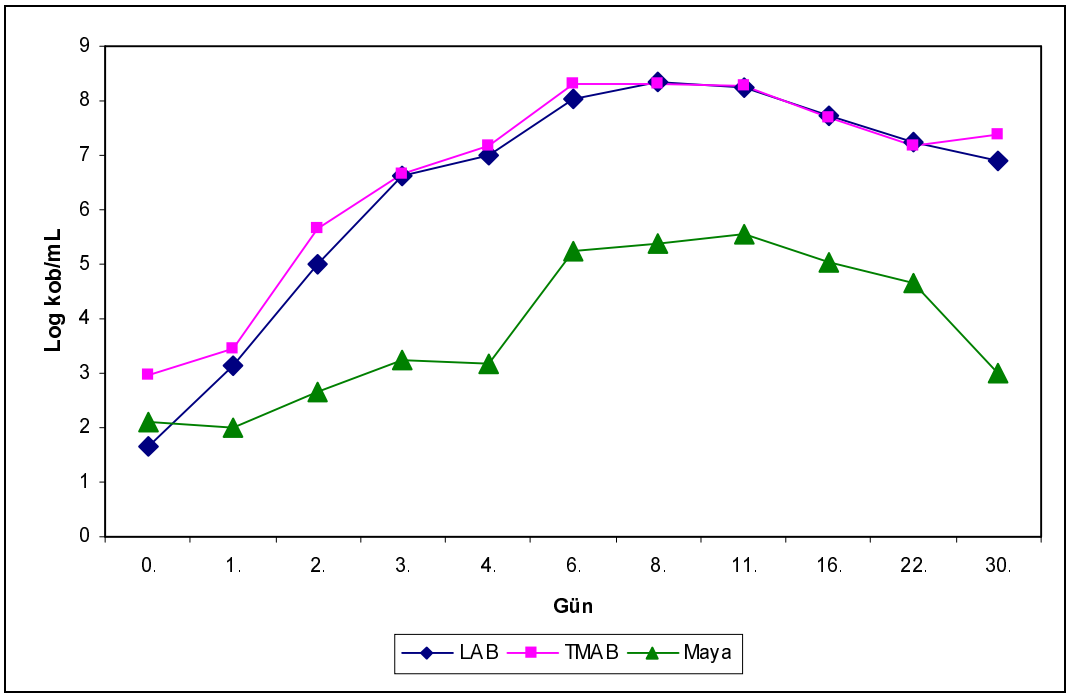
Çizelge 4.3 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşusundaki mikrobiyolojik değişimler (log kob/mL)

Gün	LAB[1)]		TMAB[2)]		MAYA***, [2)]	
	Starter	Kontrol	Starter	Kontrol	Starter	Kontrol
0.	6,29 a	1,67 d	6,43 b	2,96 b	1,67 cd	2,12 cd
1.	7,11 a	3,15 cd	7,28 b	3,46 b	1,67 d	2,00 d
2.	7,98 a	5,00 bc	8,13 a	5,65 a	2,62 bcd	2,67 bcd
3.	8,21 a	6,62 ab	8,33 a	6,65 a	3,17 bc	3,24 bc
4.	8,58 a	7,01 ab	8,55 a	7,16 a	3,72 b	3,18 b
6.	8,30 a	8,05 a	8,37 a	8,32 a	4,34 a	5,25 a
8.	8,28 a	8,35 a	8,25 a	8,32 a	4,42 a	5,37 a
10.*/11.**	7,99 a	8,24 a	8,07 a	8,27 a	4,54 a	5,56 a
12.*/16.**	7,89	7,72 x	7,89	7,69	4,75	5,02
22.		7,24 xy		7,18		4,67
30.		6,89 y		7,37		3,00

(n=6)
* Starter
** Kontrol
***Bu sonuçlar maya değerlerine aittir, örneklerde küf bulgusuna rastlanmamıştır.
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).
[2)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).



Şekil 4.3 Starter kültür katılarak üretilen hıyar turşusu salamurasındaki mikrobiyolojik değişimler (log kob/mL)

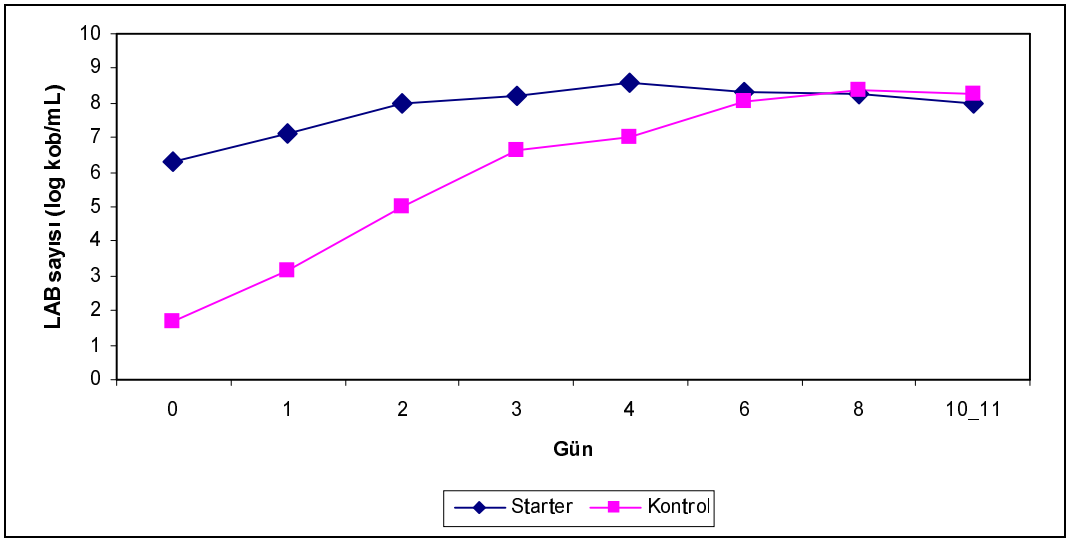


Şekil 4.4 Doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinin salamurasındaki mikrobiyolojik değişimler (log kob/mL)

Starter katılarak üretilen hıyar turşusundaki laktik asit bakterilerinin başlangıç sayısı 6,29 log kob/mL' dir. Laktik asit bakterileri 4. günde 8,58 log kob/mL ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Fermantasyonun sonunda ortamda asit birikmesi nedeniyle titrasyon asitliğinin artması ve buna bağlı olarak pH değerlerinin düşmesi sonucu LAB sayısı azalmış ve 7,89 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Starter katkısız olarak üretilen hıyar turşusundaki laktik asit bakterilerinin başlangıç sayısı 1,67 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun 2. gününden itibaren belirgin bir şekilde artan LAB sayısı, 8. günde 8,35 log kob/mL' ye kadar yükselmiş, fermantasyonun sonuna doğru azalmaya başlamış ve 30. günde de 6,89 log kob/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

LAB sayısı bakımından varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalar sonunda Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Şekil 4.5' te gruplar arasındaki farkın günlere göre değiştiği görülmektedir. Buna göre 4. güne kadar önemli bir fark gözlenirken, 4. günden itibaren fark görülmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 LAB sayısı bakımından starter ve kontrol ortalamaları arasındaki farkların günlere göre değişimi

Kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günleri karşılaştırılmış (Çizelge 4.3) ve LAB sayısı bakımından yapılan varyans analizi sonunda gün ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,05$).

LAB sayılarının ulaştığı en yüksek değerler dikkate alındığında, Özçelik vd. (1998)' nin tampon içermeyen salamuralarda $6,40.10^7$-$2,08.10^8$ kob/mL ve tampon içeren salamuralarda $5,8.10^7$-$9,4.10^8$ kob/mL, Karacakol (1998)' un $7,4.10^8$-$3,0.10^9$ kob/mL, Özçelik vd. (2001)' nin $4,7.10^8$-$8,6.10^8$ kob/mL, İç (2000)' in $3,40.10^7$-$1,73.10^8$ kob/mL, Ulu (2001)' nun $3,0.10^8$ kob/mL olarak çalışmalarında ulaştıkları değerlere benzerlik göstermektedir.

Araştırmamızda salamura örneklerindeki toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayım sonuçları çizelge 4.3, şekil 4.3 ve şekil 4.4' te verilmiştir. Starter kültür katılarak üretilen hıyar turşusu salamurasında TMAB sayısının başlangıç değeri 6,43 log kob/mL olarak belirlenmiştir. En yüksek değer olan 8,55 log kob/mL fermantasyonun 4. gününde saptanmıştır. Bu sayının 12. gün sonunda 7,89 log kob/mL' ye kadar azaldığı anlaşılmıştır. Kontrol örneklerinin salamurasında ise başlangıçta 2,96 log kob/mL olan TMAB sayısının fermantasyonun 2. gününden itibaren belirgin bir şekilde arttığı ve fermantasyonun 6. gününde 8,32 log kob/mL' ye kadar yükseldiği saptanmıştır. Fermantasyonun 30. gününde ise 7,37 log kob/mL olarak belirlenmiştir.

Kontrol ve starter ilave edilerek üretilen turşuların TMAB değerleri ortalamaları arasındaki farkların hem gruplara, hem de günlere göre değiştiği ve bu farkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

Araştırma sonunda elde edilen TMAB sayım sonuçları hıyar turşusuyla yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında; Karacakol (1998)' un $5,6.10^8$-10^{10} kob/mL, İç (2000)' in $1,44.10^8$-$5,24.10^8$ kob/mL, Özçelik vd. (2001)' nin $5,9.10^8$-$1,1.10^9$ kob/mL değerleri ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Hıyar turşusu fermantasyonunda, laktik asit bakterilerinden sonra önemli bir diğer mikroorganizma grubunu mayalar oluşturmaktadır. Başlangıç sayıları düşük olan mayaların, pH' nın azalmasıyla birlikte, gelişmeleri sınırlanan laktik asit bakterilerinin kullanamadıkları şekerleri tüketmeleri sonucunda sayılarında artış gözlenebildiği İç ve Özçelik (1995) tarafından ifade edilmektedir. Araştırmamızda çizelge 4.3' te starter katılarak üretilen hıyar turşusunda en yüksek maya sayısı 4,75 log kob/mL olarak fermantasyonun 12. gününde belirlenmiştir. Kontrol örneklerinin salamurasında ise en yüksek değer 5,56 log kob/mL ile fermantasyonun 11. gününde görülürken, bu değer fermantasyonun son günü olan 30. günde 3,00 log kob/mL' ye kadar azalmıştır (Çizelge 4.3).

Kontrol örnekleri ile starter ilave edilen örneklerin maya sayılarının ortalamaları arasında bir fark gözlenmezken, günler arasında izlenen değişimin istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($P<0,01$).

Çalışmada elde edilen maya sayım sonuçları yapılan diğer hıyar turşusu denemelerinde elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, İç (2000)' in $2,25.10^5$-$1,04.10^6$ kob/mL, Özçelik vd. (2001)' nin $1,9.10^3$-$6,0.10^5$ kob/mL ve Ulu (2001)' nun $7,2.10^5$-$1,15.10^6$ kob/mL değerleri ile benzer olduğu, ancak Karacakol (1998)' un yaptığı çalışmada elde ettiği sonuçla (< 10 kob/mL) benzerlik göstermediği belirlenmiştir.

Araştırmamızda küf sayısının < 1 log kob/mL düzeyinde kaldığı belirlenmiş olup bunun nedeninin fermantasyonların kapalı kaplarda gerçekleştirilmesi olduğu düşünülmektedir. Bu durum Karacakol (1998), İç (2000) ve Ulu (2001)' nun çalışmaları ile de uyum göstermektedir.

Deneme sonunda elde edilen enterobakteri ve koliform sayım sonuçları yapılan 3 tekerrürün tümünde 1 log kob/mL' den düşük bulunmuştur. Ulaşılan bu sonuçlar, deneme örneklerindeki pH değerinin düşük olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

McDonald *et al.* (1991) yaptıkları bir çalışmada asetik asit ilave edilmemiş örneklerde fermantasyonun başlangıcından sonraki 3 gün içerisinde 3.10^5 kob/mL olan enterobakteri sayısını 5. günün sonunda yaklaşık 10^3 kob/mL olarak bulmuşlardır. Asetik asit ilave ettikleri örneklerde ise enterobakteri sayısının 10^3 kob/mL' den gittikçe azaldığını ve 5. günün sonunda < 10 kob/mL seviyesinde olduğunu belirlemişlerdir.

Benzer şekilde Fleming *et al.* (1995) yaptıkları hıyar turşusu denemesinde fermantasyonun başlangıcında 3,5 log kob/mL olan enterobakteri sayısının, fermantasyonun 5. gününe kadar azaldığını ve 5. günden sonra yapılan analizlerde belirleyemediklerini bildirmişlerdir.

Özçelik vd. (2001) starter kültür kullanarak ürettikleri hıyar turşusu ile yürüttükleri çalışmalarında, 10 gün süren fermantasyonun 1. gününde aldıkları salamura örneklerinde $3{,}2.10^2$-$4{,}3.10^3$ kob/mL arasında enterobakteri belirlerken, doğal fermantasyon ile yürüttükleri çalışmada ise yine fermantasyonun 1. gününde $8{,}6.10^2$ kob/mL enterobakteri tespit etmişler, ancak daha sonraki günlerde belirleyememişlerdir.

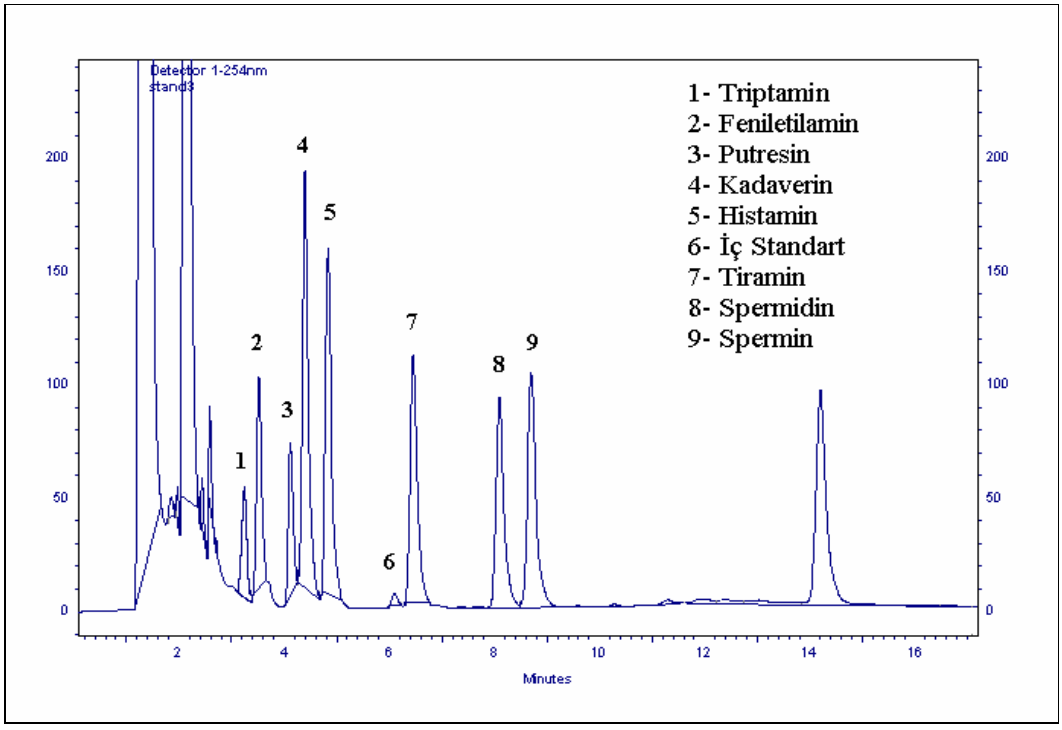
Karacakol (1998) yaptığı çalışmada pastörizasyon işlemi uygulayarak hazırladığı hıyar turşularının salamuralarında enterobakteri belirleyememiştir. Buna karşın antimikrobiyel madde olarak kullandığı K-sorbat ilaveli örneklerde ise 1. gün $2{,}3.10^2$-$7{,}2.10^3$ kob/mL olarak tespit ettiği enterobakteri sayısının 4. güne kadar azaldığını gözlemlemiş, ancak 4. günden sonra bu örneklerde enterobakteri belirleyemediğini ileri sürmüştür.

4.4 Biyojen Amin Analiz Sonuçları

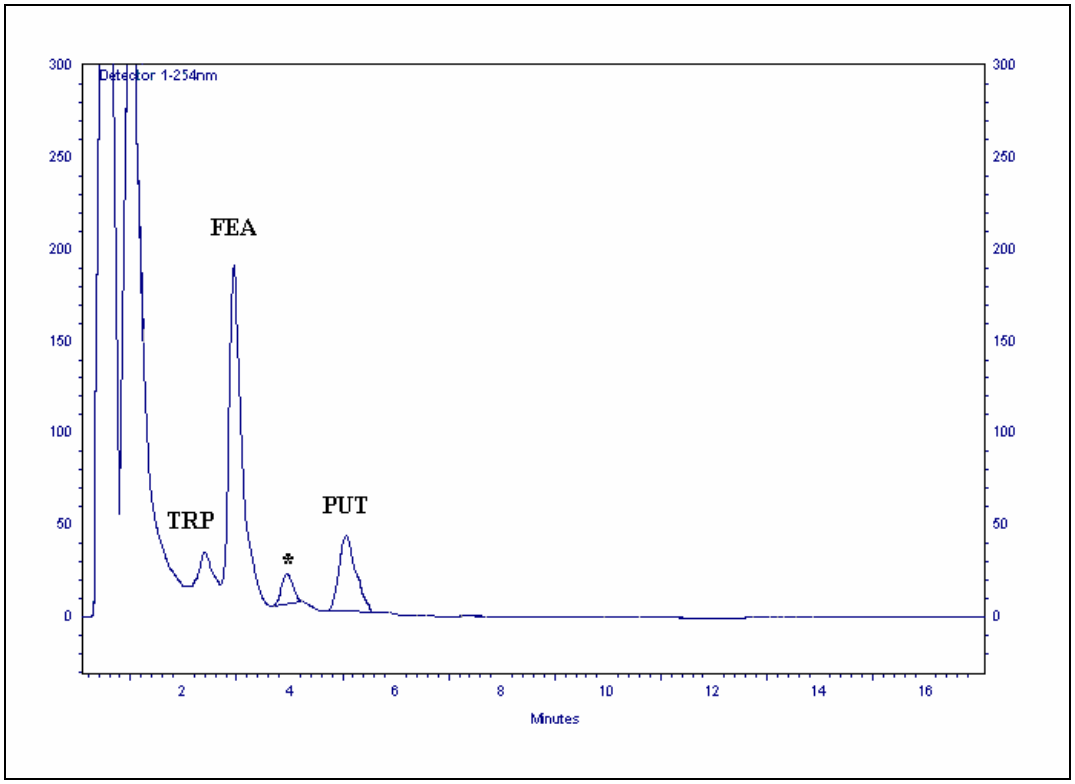
Starter ilave edilerek üretilen ve kontrol hıyar turşusu örneklerinde fermantasyon süresince oluşan triptamin (TRP), feniletilamin (FEA), putresin (PUT), kadaverin (KAD), histamin (HIS), tiramin (TRA), spermidin (SPD) ve spermin (SPM) biyojen aminlerinin düzeyleri HPLC yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Diğer yandan araştırmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* 11B starter kültürünün 3.2.6.6' da açıklandığı şekilde biyojen amin oluşturma yeteneği HPLC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda starter kültürün oluşturduğu toplam biyojen amin miktarı 0,413 µg/mL olarak bulunmuştur.

Denemede tüm biyojen aminler çok iyi bir şekilde ayrılmış olup; şekil 4.6' da biyojen aminlerin geliş zamanlarına ve sıralarına, şekil 4.7' de ise starter katkılı turşu örneğinin biyojen amin içeriğine ait kromotogramlar verilmiştir.



Şekil 4.6 Standart biyojen aminlerin geliş sırası ve sürelerini gösteren kromotogram



* Tanımlanamamış madde

Şekil 4.7 Turşu örneğinde biyojen aminleri gösteren kromotogram

Tekrarlanabilirlik değeri standart çözeltilerin dört kez enjeksiyonu ile elde edilmiştir. Normalde bu değer her zaman % 1' den düşük olmaktadır ve bizim sonuçlarımızda da bu değerin altında bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan yöntemin doğruluğunun göstergesi olan ekstraksiyon yönteminin geri kazanım oranı % 91 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4' te eğim (slope), kesim (intercept), korelasyon katsayısı (r) ve standart sapma (standart deviation) ile verilerin doğrusallığı gösterilmektedir.

Çizelge 4.4 Verilerin doğrusallığı

Biyojen Amin	Eğim (slope)	Kesim (intercept)	Korelasyon katsayısı (r)	Standart sapma	P	N
Triptamin	5579069	-371091	0,9990	28881	0,028	3
Feniletilamin	9686800	-583541	0,9999	7130	0,011	3
Putresin	4206622	-130864	0,9995	15232	0,020	3
Kadaverin	16635730	-871663	0,9970	175462	0,050	3
Histamin	11959959	-374123	0,9999	16754	0,008	3
Tiramin	10891966	-392152	0,9999	10338	0,005	3
Spermidin	8084858	-125961	0,9995	30744	0,021	3
Spermin	9612948	-152237	0,9998	21009	0,012	3

Yapılan analizler sonucu biyojen aminlerin teşhis limitleri 0,045 µg/mg TRP, 0,050 µg/mg FEA, 0,015 µg/mg PUT, 0,010 µg/mg KAD, 0,015 µg/mg HIS, 0,020 µg/mg TRA, 0,050 µg/mg SPD ve 0,050 µg/mg SPM olarak saptanmıştır.

4.4.1 Fermantasyon süresince biyojen amin miktarlarındaki değişimler

Biyojen amin oluşumu, fermantasyonun belirli günlerinde (starter katılarak üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 ve 12. günlerinde; doğal fermantasyonla üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 16, 22 ve 30. günlerinde) turşuların hem meyve hem de salamuralarından örnekler alınarak takip edilmiştir.

Araştırmada starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularının meyvelerinde ve salamuralarında fermantasyonun 0, 1 ve 2. günlerinde, kontrol örneklerinin meyvelerinde ve salamuralarında ise 0. günde yapılan analiz sonuçlarına göre biyojen amin belirlenememiştir.

4.4.1.1 Triptamin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen triptamin miktarları çizelge 4.5' te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki triptamin miktarları

Gün	TRİPTAMİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	5,985	5,740	1.
2.	ND	ND	6,610	6,294	2.
3.	0,998 a	0,838 a	7,058 b	6,362 cd	3.
4.	1,053 a	1,347 a	6,787 b	6,033 d	4.
6.	1,660 a	1,124 a	6,785 b	6,932 bc	6.
8.	1,541 a	1,268 a	6,848 b	7,450 b	8.
10.	1,597 a	1,104 a	8,361 a	9,141 a	11.
12.	1,936	1,749	8,014 xy[2)]	9,000 xy	16.
			8,007 y	8,335 y	22.
			8,738 x	9,246 x	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).
[2)] Farklı harflerle (x, y) gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

Starter kültür ilave edilerek üretilen hıyar turşularında triptaminin, fermantasyonun 3. gününden itibaren oluştuğu, meyve ve salamurada başlangıç miktarının, sırasıyla, 0,998 µg/mg ve 0,838 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon süresince en yüksek triptamin miktarları, fermantasyonun son günü olan 12. günde saptanmış olup, meyvede 1,936 µg/mg, salamurada da 1,749 µg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Starter katkısız olarak üretilen kontrol örneklerinde triptaminin, fermantasyonun 1. gününde meyvede 5,985 µg/mg ve salamurada 5,740 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde belirlenen en yüksek triptamin miktarları ise meyve ve salamurada, sırasıyla, 8,738 µg/mg ve 9,246 µg/mL olarak 30. günde belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

TRP bakımından yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur

(P<0,01). Ayrıca kontrol örneklerinin 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda TRP için meyve, salamura ve günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir (P<0,05).

Mikrobiyolojik ve kimyasal analiz sonuçlarının biyojen amin oluşumu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analizlerine göre, starter katkılı örneklerde TMAB, LAB ve maya sayılarındaki artış ile titrasyon asitliğindeki artışın ve tuz konsantrasyonundaki azalmanın istatistik olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır (P>0,05).

Dekarboksilaz enzim aktivitesini, dolayısıyla biyojen amin oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden biri pH' dır. Asidik ortamlarda biyojen amin oluşumunun bakteri için koruyucu bir mekanizma olduğu ileri sürülmektedir (Aytaç vd. 1997). Düşük pH' da daha yüksek olan dekarboksilaz enzim aktivitesi, bazı araştırmacılara göre pH 4,0-5,5 aralığında (Silla Santos 1996), bazı araştırmacılara göre de pH 2,5-6,5 aralığında optimumdur (Stratton *et al*. 1991).

Araştırmada starter ilaveli örneklerde fermantasyon süresince izlenen pH değeri 3,40-4,18 aralığında değişim göstermiştir. pH' nın biyojen amin oluşumu için gerekli olan optimum değerler arasında olması triptamin oluşumunu etkilemiş ve pH ile triptamin arasındaki negatif korelasyon istatistik olarak önemli bulunmuştur (P<0,05).

Kontrol örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizlere göre TMAB (P<0,05), LAB (P<0,05) ve maya (P<0,01) sayılarındaki artış biyojen amin oluşumunu etkilemiş ve triptamin miktarını artırmıştır. İç ve Özçelik (1995), mayaların gelişmeleri ile ortamdaki pH' nın düşmesiyle birlikte asitliğin artmasına yol açtıklarını ifade etmişlerdir. Her ne kadar mayalarda dekarboksilaz enzimi bulunmamasına karşın, biyojen amin miktarlarını etkilemelerinin aynı nedene bağlı olduğu ve dolaylı olarak biyojen amin oluşumuna katkıda bulundukları düşünülmektedir.

Denemede kontrol örnekleri için fermantasyon süresince gözlenen pH değeri 3,45-4,22 aralığında belirlenmiştir. pH değerindeki azalmanın, dolayısıyla titrasyon asitliğindeki artışın istatistik olarak önemli olduğu ve triptamin miktarının artmasına neden olduğu bulunmuştur ($P<0,01$). Tuz konsantrasyonundaki değişimin ise triptamin oluşumuna etkisi olmadığı saptanmıştır ($P>0,05$).

Yücel vd. (2001) HPLC yöntemini kullanarak geleneksel olarak üretilmiş salamuralı ve % 1 sitrik asitle pH' sı ayarlanmış salamuralı lahana turşularındaki biyojen amin oluşumlarını inceledikleri çalışmalarında, % 8 tuz ve % 8 tuz ile % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşularındaki triptamin miktarını 19 gün süren fermantasyonun sonunda, sırasıyla, 1,71 ve 0,94 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

García-García *et al*. (2001), yaptıkları çalışmalarında ticari olarak hazırlanan farklı sofralık zeytinlerin, kebere, kebere meyvesi ve hıyar turşularının biyojen amin içeriklerini araştırmışlardır. Bütün örneklerde toplam biyojen amin miktarının, meyvenin her 1 kg için 60 mg' dan daha az olduğu sonucuna varmışlardır. Piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinde biyojen amin konsantrasyonlarını düşük seviyelerde gözlemlerken, bu örneklerde triptamin varlığına rastlamadıklarını ifade etmişlerdir.

Akbaş (2006), HPLC yöntemini kullanarak yürüttüğü çalışmasında piyasadan temin ettiği toplam 100 adet pastörize ve pastörize edilmemiş turşu örneği ile 20 adet ev yapımı turşu örneğinin biyojen amin içeriğini araştırmıştır. Buna göre; 4 adet ticari hıyar turşusu örneğinin meyvesinde 1,07-5,74 mg/kg, salamurasında ise 2,37-7,14 mg/L triptamin belirlerken; ev yapımı 2 adet hıyar turşusu örneğinin meyvesinde 3,24-4,28 mg/kg, salamurasında da 0,52-3,96 mg/L triptamin tespit etmiştir.

Denemede fermantasyon sonunda elde edilen triptamin miktarları starter katkılı örneklerin meyvelerinde 1,936 µm/mg ve salamuralarında 1,749 µg/mL; kontrol örneklerinin meyvelerinde 8,738 µg/mg ve salamuralarında 9,246 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar Akbaş (2006)' ın çalışmasıyla karşılaştırıldığında starterli örneklerin ticari örneklerle benzerlik gösterdiği, ancak ev yapımı örneklerindeki triptamin miktarlarından daha düşük miktarlarda bulunduğu görülmektedir. Kontrol örneklerinin ise hem ticari hem de ev yapımı örneklerden daha fazla triptamine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, her ne kadar lahana turşusu olsa da Yücel vd. (2001)' nin elde ettiği triptamin miktarlarından da yüksek olduğu gözlenmiştir.

Literatürde, turşularda triptamin miktarı için belirlenmiş bir toksik limit değerine rastlanmamıştır.

4.4.1.2 Feniletilamin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen feniletilamin miktarları çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki feniletilamin miktarları

Gün	FENİLETİLAMİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	10,676	12,887	1.
2.	ND	ND	11,833	21,305	2.
3.	2,273 c	2,257 c	14,263 b	22,550 e	3.
4.	2,509 c	5,969 ab	11,270 c	26,543 d	4.
6.	2,852 bc	6,636 a	11,870 c	27,500 c	6.
8.	3,606 ab	6,044 ab	14,117 b	37,980 b	8.
10.	3,901 a	5,675 b	17,987 a	47,267 a	11.
12.	3,653	4,633	20,029 z	38,653 x	16.
			21,632 y	24,827 z	22.
			28,369 x	29,817 y	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).

Feniletilamin, starter katkılı hıyar turşularında fermantasyonun 3. gününden itibaren belirlenmiş olup, 3. gündeki miktarı meyve ve salamurada, sırasıyla, 2,273 µg/mg ve 2,257 µg/mL' dir. Meyvede belirlenen en yüksek feniletilamin miktarı 3,901 µg/mg olarak 10. günde bulunurken, fermantasyonun son günü olan 12. günde ise 3,653 µg/mg olarak saptanmıştır. Salamurada gözlenen en yüksek feniletilamin miktarı ise 6. günde 6,636 µg/mL olarak bulunmuş ve fermantasyonun 12. gününde 4,633 µg/mL' ye kadar azalmıştır (Çizelge 4.6). Fermantasyon süresince biyojen amin miktarlarının azalması bazı araştırıcılara göre aminolitik bakterilerin aktivitelerine bağlanmıştır (Yücel vd. 2001).

Starter ilave edilmeden üretilen hıyar turşusu örneklerinde 1. günden başlayarak feniletilamin oluşumu gözlenmiş ve meyvede 10,676 µg/mg, salamurada 12,887 µg/mL olarak belirlenmiştir. Meyvede 28,369 µg/mg ile en yüksek feniletilamin miktarı 30. günde saptanmıştır. Salamurada ise en yüksek feniletilamin miktarı 47,267 µg/mL ile 11. günde tespit edilmiş olup, fermantasyonun sonu olan 30. günde de 29,817 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

FEA bakımından yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizlerine göre ise FEA miktarının meyve ve salamurada günlere göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,01$).

Starter katkılı örneklerde TMAB, LAB, maya, titrasyon asitliği ve tuz konsantrasyonundaki değişimlerin FEA oluşumu üzerine etkili olmadığı ($P>0,05$), ancak pH' daki azalma ile FEA miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Kontrol örneklerinde ise TMAB, LAB, maya sayılarındaki artışla titrasyon asitliğindeki artış ve pH değerindeki azalma FEA miktarı üzerinde etkili olmuş ve bu etki istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Tuz konsantrasyonundaki değişimin ise önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$).

Akbaş (2006), 4 adet ticari hıyar turşusu örneğindeki feniletilamin miktarlarını meyvede 0,63-1,63 mg/kg, salamurada 0,88-1,36 mg/L olarak belirlemiştir. Ev yapımı 2 adet hıyar turşusu örneğindeki miktarları ise meyvede 1,21-1,48 mg/kg feniletilamin, salamurada 0,73-0,79 mg/L feniletilamin olarak saptamıştır.

Denemede starter ilave edilerek üretilen hıyar turşusu fermantasyonu sonunda elde edilen feniletilamin miktarları meyve ve salamurada, sırasıyla, 3,653 µg/mg ve 4,633 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde ise, yine fermantasyonun sonunda, meyvede 28,369 µg/mg, salamurada 29,817 µg/mL feniletilamin olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Akbaş (2006)' ın çalışmasıyla karşılaştırıldığında, hem ticari hem de ev yapımı örneklerde belirlenen feniletilamin miktarlarından çok yüksek olduğu görülmektedir.

Fermente gıdalarda feniletilamin için bildirilen toksik limit 30 mg/kg' dır (ten Brink *et al*. 1990). Kontrol örneklerinden elde edilen değerler toksik limite çok yakın bulunurken, starterli örneklerdeki feniletilamin miktarının bu değerin altında olduğu anlaşılmıştır.

4.4.1.3 Putresin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen putresin miktarları çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki putresin miktarları

Gün	PUTRESİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	2,950	0,398	1.
2.	ND	ND	3,747	0,634	2.
3.	0,829 b	2,941 a	6,420 e	0,712 b	3.
4.	0,913 b	2,320 b	7,143 d	1,031 b	4.
6.	1,009 b	2,630 ab	7,804 c	1,033 b	6.
8.	1,799 a	2,328 b	10,002 b	1,060 b	8.
10.	1,564 a	2,176 b	16,023 a	1,741 a	11.
12.	2,183	11,863	14,880 z	1,754 x	16.
			16,675 y	1,236 x	22.
			20,492 x	0,599 x	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).

Putresin, starter kültür ilave edilen örneklerde fermantasyonun 3. gününden itibaren belirlenmiştir ve meyvede 0,829 µg/mg, salamurada 2,941 µg/mL olarak bulunmuştur. Meyve ve salamurada belirlenen en yüksek putresin miktarı ise fermantasyonun sonu olan 12. günde, sırasıyla, 2,183 µg/mg ve 11,863 µg/mL' dir (Çizelge 4.7).

Starter katkısız olan kontrol örneklerinde fermantasyonun 1. gününden itibaren oluşmaya başlayan putresin, meyve ve salamurada, sırasıyla, 2,950 µg/mg ve 0,398 µg/mL olarak bulunmuştur. En yüksek putresin miktarı meyvede 20,492 µg/mg olarak 30. günde belirlenirken, salamurada 16. günde 1,754 µg/mL olarak saptanmıştır. Salamurada fermantasyonun sonunda belirlenen miktar ise 0,599 µg/mL' dir (Çizelge 4.7).

PUT bakımından yapılan varyans analizlerine göre Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonunun ve kontrol örneklerinin 16, 22 ve 30.

günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Gün interaksiyonunun istatistik olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,01$).

Starter katkılı örneklerdeki PUT miktarları ile TMAB sayısındaki artış arasında bir ilişki olduğu ($P<0,05$), ancak LAB, maya, titrasyon asitliği, pH değerleri ve tuz konsantrasyonun PUT miktarına etki etmediği belirlenmiştir ($P>0,05$). Kontrol örneklerinde ise PUT oluşumu ile TMAB, LAB, maya sayılarındaki artış arasında pozitif korelasyon gözlenirken, pH değerindeki azalma ile negatif korelasyon olduğu saptanmıştır ($P<0,01$). PUT miktarı ile tuz konsantrasyonu ve titrasyon asitliği arasındaki ilişkinin ise önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$).

Yücel vd. (2001), % 8 tuzlu lahana turşusunda putresin miktarını 17,7 mg/kg, % 8 tuz ve % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşusundaki putresin miktarını ise 6,34 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

García-García *et al*. (2001) piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerindeki ortalama putresin miktarını 4,5 mg/kg olarak bulmuşlardır.

Akbaş (2006), ticari hıyar turşusu örneklerinin meyvelerinde 0,16-0,23 mg/kg putresin, salamuralarında da 0,15-0,35 mg/L putresin belirlerken; ev yapımı hıyar turşusu örneklerinde ise putresin olmadığını belirlemiştir.

Yapılan bu çalışmada, fermantasyon sonunda starterli örneklerin meyvelerinde ve salamuralarında belirlenen putresin miktarları, sırasıyla, 2,183 µg/mg ve 11,863 µg/mL; kontrol örneklerinde bulunan putresin miktarları ise meyvede 20,492 µg/mg, salamurada 0,599 µg/mL olarak belirlenmiştir. Araştırmadan elde edilen bu sonuçların Yücel vd. (2001), García-García *et al*. (2001) ve Akbaş (2006)' ın belirledikleri değerlerden yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Kontrol ve starter katkılı turşu örnekleri için belirlenen putresin miktarlarının, toksik limit olan 396 mg/kg putresin (Stratton *et al*. 1991) değerinden düşük olduğu belirlenmiştir.

4.4.1.4 Kadaverin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen kadaverin miktarları çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki kadaverin miktarları

Gün	KADAVERİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	0,617	0,644	1.
2.	ND	ND	0,633	0,618	2.
3.	0,532 b	0,603 b	0,621 b	0,604 b	3.
4.	0,616 ab	0,607 ab	0,612 ab	0,620 ab	4.
6.	0,625 a	0,612 a	0,622 a	0,632 a	6.
8.	0,624 ab	0,583 ab	0,628 ab	0,596 ab	8.
10.	0,651 a	0,616 a	0,638 a	0,618 a	11.
12.	0,669	0,672	0,622	0,638	16.
			0,627	0,618	22.
			0,647	0,623	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

Starter katkılı turşu örneklerinde kadaverinin, fermantasyonun 3. gününde oluştuğu gözlenmiş, meyve ve salamurada, sırasıyla, 0,532 µg/mg ve 0,603 µg/mL olarak bulunmuştur. En yüksek kadaverin miktarı ise 12. günde belirlenmiş olup, meyvede 0,669 µg/mg, salamurada 0,672 µg/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Kadaverinin, doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinde 1. günden başlayarak oluştuğu tespit edilmiştir. Meyvede, fermantasyonun 1. gününde 0,617 µg/mg olarak belirlenen kadaverin miktarının, en yüksek miktar olan 0,647 µg/mg' a 30. günde ulaştığı gözlenmiştir. Salamura örneklerinde ise en yüksek kadaverin miktarının 1. günde belirlenen 0,644 µg/mL olduğu ve 30. günde 0,623 µg/mL olarak bulunduğu çizelge 4.8' de görülmektedir (Çizelge 4.8).

KAD için gruplar (starter katkılı ve kontrol) arasında farklılık söz konusu değilken, günlere göre olan değişimin istatistik olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,05$). Starter katkısız olarak üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda KAD için meyve, salamura ve günler arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$).

Starter ilave edilen turşu örneklerinde TMAB sayısındaki artışın KAD oluşumunu % 5 düzeyinde etkilediği gözlenmiştir. Ancak LAB ve maya sayılarındaki artış ile titrasyon asitliğindeki artışın ve pH değeri ile tuz konsantrasyonundaki azalmanın KAD miktarına etki etmediği saptanmıştır ($P>0,05$). Kontrol örneklerinde ise, yapılan kimyasal ve mikrobiyolojik analizler sonucunda elde edilen değerler ile KAD miktarındaki değişimler arasında istatistik olarak bir önem olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$).

Yücel vd. (2001), % 8 tuzlu lahana turşusunda kadaverin miktarını 3,18 mg/kg, % 8 tuz ve % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşusundaki kadaverin miktarını ise 11,63 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

García-García *et al*. (2001), piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinde yaptıkları analizler sonucunda kadaverin varlığına rastlamamışlardır.

Akbaş (2006), ticari hıyar turşularının meyvelerinde 0,20-4,36 mg/kg ve salamuralarında 0,52-5,41 mg/L kadaverin saptamıştır. Ev yapımı hıyar turşusu

örneklerinde ise meyvede 6,41-9,58 mg/kg, salamurada 13,14-21,74 mg/L kadaverin belirlemiştir.

Çalışmada, starter katkılı örneklerde fermantasyon sonunda belirlenen kadaverin miktarları meyve ve salamurada, sırasıyla, 0,669 µg/mg ve 0,672 µg/mL' dir. Kontrol örneklerinde ise meyvede 0,647 µg/mg, salamurada 0,623 µg/mL kadaverin saptanmıştır. Buna göre elde edilen sonuçlar Akbaş (2006)' ın çalışmasıyla karşılaştırıldığında; ticari örneklerde belirlenen kadaverin miktarlarıyla benzer olduğu, ancak hem starterli hem de kontrol örneklerinin ev yapımı örneklerden çok düşük miktarlarda kadaverin içerdiği anlaşılmıştır. Yücel vd (2001)' nin çalışmasında belirlenen sonuçlara göre ise lahana turşusundaki kadaverin içeriğinin bizim çalışmamızda saptanan kadaverin miktarından daha yüksek olduğu görülmektedir.

Fermente ürünlerde kadaverin için belirlenen toksik limitler bulunmamasına karşın, starter ve kontrol örneklerinin her ikisinde de kadaverin miktarları çok düşük düzeylerde belirlenmiştir.

4.4.1.5 Histamin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen histamin miktarları çizelge 4.9' da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki histamin miktarları

Gün	HİSTAMİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	1,564	0,656	1.
2.	ND	ND	1,582	0,554	2.
3.	0,488 a	0,551 a	1,611 b	0,566 a	3.
4.	0,574 a	0,585 a	1,569 b	0,552 a	4.
6.	0,621 a	0,578 a	2,769 a	0,551 a	6.
8.	0,574 a	0,512 a	2,808 a	0,591 a	8.
10.	0,580 a	0,566 a	2,755 a	0,568 a	11.
12.	0,658	0,580	2,770 y	0,561 x	16.
			2,807 y	0,544 x	22.
			3,810 x	0,604 x	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).

Starter kültür ilave edilen hıyar turşusu örneklerinde histamin oluşumu fermantasyonun 3. gününde başlamış olup, meyvede 0,488 µg/mg, salamurada 0,551 µg/mL olarak belirlenmiştir. En yüksek histamin miktarına meyvede 0,658 µg/mg ile 12. günde, salamurada ise 0,585 µg/mL ile 4. günde ulaşılmıştır. Ayrıca salamurada fermantasyonun son günü olan 12. günde 0,580 µg/mL histamin belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Starter katkısız kontrol örneklerinde fermantasyonun 1. gününden itibaren oluşmaya başlayan histamin, meyvede 1,564 µg/mg olarak bulunmuş ve en yüksek miktar olarak 3,810 µg/mg ile 30. günde belirlenmiştir. Salamura örneklerinde ise en yüksek miktar fermantasyonun 1. gününde 0,656 µg/mL olarak bulunmuş ve 30. günde 0,604 µg/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.9).

HIS bakımından yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonunun ve kontrol örneklerinde fermantasyonun 16,

22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda HIS' in Meyve ve Salamura X Gün interaksiyonunun istatistik olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,01$).

Starter ilave edilen turşu örneklerinde belirlenen HIS miktarları ile kimyasal ve mikrobiyolojik bulgular arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır ($P>0,05$). Ancak kontrol örneklerinde TMAB ve LAB sayılarındaki artışın istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Biyojen aminlerden tiramin ve histaminin, bakterilerde üremenin geç logaritmik evresinde veya duraklama-ölüm evresinde oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca bazı bakteri suşlarının taşıdıkları histaminaz enzimi ile ortamda histamin birikimini sınırladıkları da belirtilmektedir (Aytaç vd. 1997).

García-García *et al*. (2001), piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinin hiçbirinde histamin belirleyemediklerini ifade etmişlerdir.

Ekici ve Coşkun (2004), Van ilindeki marketlerden toplanan 50 adet sebze turşusu örneğinde (28 adet karışık, 6 adet kırmızı biber ve 7 adet hıyar turşusu) histamin miktarını fluorometrik yöntem kullanarak araştırmışlardır. Hıyar turşusundaki histamin seviyesini minimum 26,66 mg/kg, maksimum 44,72 mg/kg (ortalama 34,73 mg/kg) olarak belirlemişlerdir.

Akbaş (2006), piyasadan temin ettiği 4 adet hıyar turşusu örneğinin meyvesinde 0,03-0,87 mg/kg; salamurasında ise 0,06-0,77 mg/L histamin belirlemiştir. Ev yapımı 2 adet hıyar turşusu örneğinde ise meyvede 0,28-1,35 mg/kg, salamurada 0,01-0,84 mg/L histamin bulmuştur.

Araştırmamızda, starterli örneklerde histamin için fermantasyon sonunda meyvede 0,658 µg/mg, salamurada 0,580 µg/mL olarak belirlenen değerler, kontrol örneklerinde meyvede 3,810 µg/mg, salamurada da 0,604 µg/mL olarak saptanmıştır. Starter katılan

örneklerden elde edilen sonuçlar Akbaş (2006)' ın ticari ve ev yapımı örnekleri ile benzerlik gösterirken, kontrol örneklerinden elde edilen değerler ise yüksek bulunmuştur. Ancak, hem starter katkılı hem de kontrol örneklerinde belirlenen histamin miktarlarının, Ekici ve Coşkun (2004)' un çalışmalarında belirledikleri histamin miktarlarından çok düşük olduğu anlaşılmıştır.

Starter ve kontrol örneklerinin her ikisinde de belirlenen histamin miktarlarının, toksik limit olan 100 mg/kg histamin (ten Brink *et al*. 1990) düzeyinin altında olduğu görülmektedir.

4.4.1.6 Tiramin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen tiramin miktarları çizelge 4.10' da verilmiştir.

Çizelge 4.10 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki tiramin miktarları

Gün	TİRAMİN				Gün
	Starter [1)]		Kontrol [1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	1,837	1,830	1.
2.	ND	ND	1,829	1,937	2.
3.	0,864	0,733	1,867	1,914	3.
4.	0,867	0,788	1,894	1,880	4.
6.	0,852	0,828	2,126	1,908	6.
8.	0,815	0,803	2,235	1,922	8.
10.	0,791	0,809	1,905	2,005	11.
12.	0,814	0,815	1,856	1,928	16.
			1,988	2,139	22.
			1,831	1,899	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Starter ve kontrol örnekleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).

Starter kültür ilave edilerek üretilen hıyar turşularında tiramin oluşumu fermantasyonun 3. gününde başlamış ve meyvede 0,864 µg/mg, salamurada 0,733 µg/mL olarak bulunmuştur. Meyvede en yüksek tiramin miktarı 0,867 µg/mg ile 4. günde belirlenirken, 12. günde 0,814 µg/mg olarak saptanmıştır. Salamurada ise en yüksek tiramin miktarı 12. günde 0,815 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Kontrol örneklerinde ise tiramin, fermantasyonun 1. gününden itibaren belirlenmeye başlanmış olup, meyve ve salamurada, sırasıyla, 1,837 µg/mg ve 1,830 µg/mL olarak saptanmıştır. Bulunan en yüksek tiramin miktarı meyvede 2,235 µg/mg ile 8. günde, salamurada 2,139 µg/mL ile 22. günde gözlenmiştir. Fermantasyonun sonu olan 30. günde ise meyvede 1,831 µg/mg ve salamurada 1,899 µg/mL tiramin olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10).

TRA için yapılan varyans analizleri sonunda günler arasında bir fark gözlenmezken, kontrol ve starter kültür ilave ederek hıyar turşusu üretmek arasında bir fark olduğu ve bu farkın istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$). Kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda TRA için meyve, salamura ve günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$).

Starter katılan örneklerde TRA miktarı ile tuz konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenirken ($P<0,05$); TMAB, LAB ve maya sayılarındaki ve titrasyon asitliğindeki artış ile pH değerindeki azalmanın istatistik olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$). Kontrol örneklerinde ise mikrobiyolojik ve kimyasal değerlerdeki değişimlerin TRA oluşumuna etki etmediği saptanmıştır ($P>0,05$).

Aytaç vd. (1997), fermente ürünlerde ortamdaki tuz konsantrasyonun biyojen amin oluşumuna önemli katkısı olduğunu, sıvı besiyerinde yaptıkları bir çalışma ile vurgulamışlardır. Çalışmalarında Tripton Soya Histidin sıvı besiyerinde *Morganella morganii* ve *Proteus vulgaris* tarafından histamin üretimi için gerekli optimum

parametreleri araştırmışlardır. Buna göre, *M. morganii*' nin histamin üretimi için optimum pH 5,0' te % 4 tuz konsantrasyonunda, *P. vulgaris*' in ise pH 6' da % 1 tuz konsantrasyonunda maksimum düzeyde histamin oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Yücel vd. (2001), % 8 tuzlu lahana turşusunda 0,86 mg/kg tiramin belirlerken, % 8 tuz ve % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşusunda tiramini saptayamamışlardır.

García-García *et al*. (2001), ticari olarak satışa sunulan hıyar turşusu örneklerindeki tiramin miktarını 0,7 mg/kg olarak tespit etmişlerdir.

Akbaş (2006), ticari hıyar turşusu örneklerinin meyvelerinde 0,50-2,73 mg/kg, salamuralarında 1,19-3,69 mg/L tiramin belirlerken, ev yapımı örneklerde ise tiramin miktarını meyvede 0,91-1,04 mg/kg ve salamurada 1,51-2,12 mg/L olarak bulmuştur.

Denemede, fermantasyon sonunda starterli örneklerden elde edilen tiramin miktarları meyvede 0,814µg/mg, salamurada 0,815 µg/mL' dir. Kontrol örneklerinde ise meyvede 1,831 µg/mg, salamurada 1,899 µg/mL tiramin saptanmıştır. Elde edilen sonuçların Yücel vd. (2001), García-García *et al*. (2001) ve Akbaş (2006)' ın belirledikleri değerlerle benzer olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada belirlenen tiramin miktarları, 100-800 mg/kg tiramin (Maijala and Eorola 1993) olan toksik limitin altında bulunmuştur.

4.4.1.7 Spermidin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen spermidin miktarları çizelge 4.11' de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki spermidin miktarları

Gün	SPERMİDİN				Gün
	Starter		Kontrol		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	0,666	0,640	1.
2.	ND	ND	0,710	0,682	2.
3.	0,681	0,644	0,694	0,682	3.
4.	0,676	0,693	0,701	0,691	4.
6.	0,663	0,649	0,696	0,678	6.
8.	0,675	0,675	0,700	0,713	8.
10.	0,684	0,676	0,698	0,746	11.
12.	0,686	0,715	0,706	0,760	16.
			0,684	0,739	22.
			0,676	0,787	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi

Starter kullanılarak üretilen turşu örneklerinde spermidin, fermantasyonun 3. gününde oluşmaya başladığı ve meyvede 0,681 µg/mg ve salamurada 0,644 µg/mL olduğu belirlenmiştir. En yüksek spermidin miktarları ise fermantasyonun son günü olan 12. günde meyve ve salamurada, sırasıyla, 0,686 µg/mg ve 0,715 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinde ise spermidin oluşumu fermantasyonun 1. gününden itibaren gözlenmiştir. Meyvede 1. günde 0,666 µg/mg spermidin belirlenirken, en yüksek miktar olan 0,710 µg/mg fermantasyonun 2. gününde bulunmuştur. 30. günde ise 0,676 µg/mg spermidin saptanmıştır. Salamurada ise fermantasyonun 1. gününde 0,640 µg/mL olan spermidin miktarının arttığı ve 30. günde 0,787 µg/mL ile en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11).

SPD için yapılan varyans analizleri sonucunda, meyve ve salamura, gruplar veya günler arasında istatistik olarak bir fark görülemezken, kontrol olarak üretilen hıyar turşularında fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri

sonunda SPD için meyve, salamura ve günler arasındaki farklılıklar da istatistik olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05).

Kontrol örneklerindeki ve starter ilave edilen örneklerdeki SPD miktarları ile TMAB, LAB, maya, titrasyon asitliği, pH değerleri ve tuz konsantrasyonu arasındaki değişimlerin istatistik olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (P>0,05).

Yücel vd. (2001), % 8 tuz ve % 8 tuz ile % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşularındaki spermidin miktarlarını sırasıyla 0,80 ve 1,01 mg/kg olarak bulmuşlardır.

García-García *et al*. (2001), piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinde spermidin varlığına rastlamamışlardır.

Akbaş (2006), 4 adet ticari hıyar turşusu örneğinin meyvesinde 0-1,68 mg/kg ve salamurasında 0-1,66 mg/L spermidin belirlemiştir. Ev yapımı turşu örneklerinde ise meyvede 0,97-0,92 mg/kg ve salamurada 1,44-2,88 mg/L spermidin saptamıştır.

Araştırmada, starter ve kontrol örneklerinin meyve ve salamuralarında fermantasyon sonunda belirlenen spermidin miktarları çok düşük düzeylerdedir. Starterli örneklerde meyvede 0,686 µg/mg, salamurada 0,715 µg/mL spermidin; kontrol örneklerinde ise meyvede 0,676 µg/mg, salamurada da 0,787 µg/mL spermidin tespit edilmiştir. Elde edilen değerler, Yücel vd. (2001)' nin lahana turşularından saptadığı ve Akbaş (2006)' ın ticari örneklerde belirlediği miktarlarla benzerlik gösterirken, bu değerlerin ev yapımı örneklerden daha düşük miktarlarda olduğu anlaşılmaktadır.

Literatür verilerine göre turşu örneklerinde spermidin miktarı ile ilgili herhangi bir toksik limit bulunmamaktadır.

4.4.1.8 Spermin miktarı

Starter kültür ilave edilen ve doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerinde, fermantasyon süresince belirlenen spermin miktarları çizelge 4.12' de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki spermin miktarları

Gün	SPERMİN				Gün
	Starter [1)]		Kontrol [1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	5,713	5,590	1.
2.	ND	ND	5,840	5,833	2.
3.	0,515	0,482	5,857	5,747	3.
4.	0,529	0,586	5,807	5,884	4.
6.	0,522	0,589	5,763	5,926	6.
8.	0,542	0,614	5,797	6,396	8.
10.	0,598	0,666	6,347	6,688	11.
12.	0,591	0,764	5,873	6,402	16.
			5,730	6,473	22.
			5,790	6,536	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Starter ve kontrol örnekleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,01$).

Starter katkılı turşu örneklerinde spermin oluşumu fermantasyonun 3. gününde başlamış olup, meyve ve salamurada, sırasıyla, 0,515 µg/mg ve 0,482 µg/mL olarak belirlenmiştir. Meyvede belirlenen en yüksek triptamin miktarı 0,598 µg/mg ile 10. günde gözlenirken, 12. günde 0,591 µg/mg spermin olarak bulunmuştur. Salamura örneklerinde ise en yüksek spermin miktarının 12. günde 0,764 µg/mL olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Kontrol örneklerinde, starterli örneklere oranla fermantasyonun 1. gününde başlayan spermin oluşumu; meyvede 5,713 µg/mg, salamurada ise 5,590 µg/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol örneklerinin meyve ve salamuralarında en yüksek spermin miktarları 11. günde, sırasıyla, 6,347 µg/mg ve 6,688 µg/mL olarak bulunmuştur.

Fermantasyonun 30. gününde belirlenen spermin miktarları ise, yine sırasıyla, 5,790 µg/mg ve 6,536 µg/mL' dir (Çizelge 4.12).

SPM için yapılan varyans analizleri sonunda günler arasında bir fark gözlenmezken, kontrol ve starter kültür ilave ederek hıyar turşusu üretmek arasındaki farkın istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$). Kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonucunda ise SPM için meyve, salamura ve günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($P>0,05$).

Starter ilave edilerek üretilen turşulardaki SPM miktarları ile kimyasal ve mikrobiyolojik bulgular arasında istatistiksel olarak bir ilişki olmadığı anlaşılmıştır ($P>0,05$). Ancak kontrol örneklerindeki SPM biyojen aminlerinin oluşumuyla maya sayısı arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Yücel vd. (2001), % 8 tuzlu lahana turşusunda spermin miktarını 5,05 mg/kg, % 8 tuz ve % 1 sitrik asit ilave edilerek üretilen lahana turşusundaki spermin miktarını ise 4,55 mg/kg olarak bulmuşlardır.

García-García *et al.* (2001) piyasadan toplanan hıyar turşularının biyojen amin içeriklerini araştırdıkları çalışmada ortalama spermin miktarını 2,90 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

Akbaş (2006), ticari hıyar turşusu örneklerinde meyvede 0-0,74 mg/kg, salamurada 0-1,50 mg/L spermin belirlemiş; ev yapımı turşu örneklerinde ise meyvede 0,53-0,56 mg/kg, salamurada 0,46-0,69 mg/L spermin saptamıştır.

Araştırmada starter ilave edilerek üretilen hıyar turşusu fermantasyonu sonunda elde edilen spermin miktarları, meyve ve salamurada, sırasıyla, 0,591 µg/mg ve 0,764 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde ise, yine fermantasyonun sonunda,

meyvede 5,790 µg/mg, salamurada 6,536 µg/mL spermin bulunmuştur. Starter katkılı hıyar turşularından elde edilen sonuçların, Akbaş (2006)' ın değerleri ile benzerlik gösterdiği, García-García *et al*. (2001)' un belirlediği 2,90 mg/kg değerinden ise düşük olduğu anlaşılmıştır. Kontrol örneklerinde ise belirlenen spermin miktarlarının, yapılan bu çalışmalarda elde edilen sonuçlardan yüksek olduğu, ancak Yücel vd. (2001)' nin lahana turşusunda belirlediği spermin miktarları ile benzer olduğu gözlenmiştir.

Yapılan pek çok çalışmada, turşu örneklerinde spermin miktarı için saptanan herhangi bir toksik limit düzeyi bulunmamaktadır.

4.4.1.9 Toplam biyojen amin miktarı

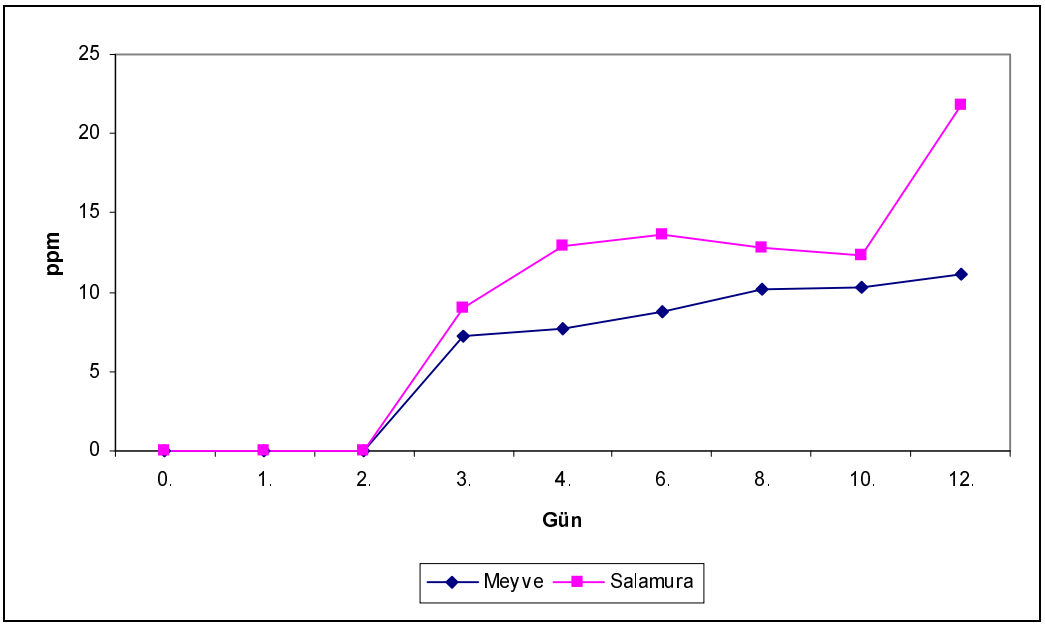
Starter katkılı hıyar turşularında fermantasyonun 3. gününden itibaren biyojen aminler tespit edilirken, kontrol örneklerinde fermantasyonun 1. gününde biyojen aminlerin oluştuğu gözlenmiştir (Çizelge 4.13). Özellikle 8,98 log kob/mL düzeyinde *L. plantarum* 11B starter kültürü (3 tekerrürün ortalaması, çizelge 4.1) ilave edilerek üretilen örneklerde, kontrol örneklerine oranla biyojen amin miktarlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Špička *et al*. (2002) tarafından hücresel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada hem doğal yolla hem de *L. plantarum* (5.10^5 kob/g düzeyinde) kullanılarak üretilen sauerkrautlarda biyojen amin oluşumu izlenmiştir. Çalışmada alınan sonuçlara göre starter katkısının putresin, tiramin ve kadaverinin üretim miktarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Diğer yandan, starter kültür katılan örneklerde spermidin içeriğinin 10 ile 30 mg/kg arasında değiştiği, ancak spermidin miktarında herhangi bir azalmaya neden olmadığı; buna karşın triptamin, spermin ve histamin miktarlarının azaldığı ve hatta teşhis limitlerinin altına indiği saptanmıştır.

Çizelge 4.13, şekil 4.8 ve şekil 4.9' da starter ve kontrol örneklerinde fermantasyon süresince belirlenen toplam biyojen amin miktarlarındaki değişimler görülmektedir.

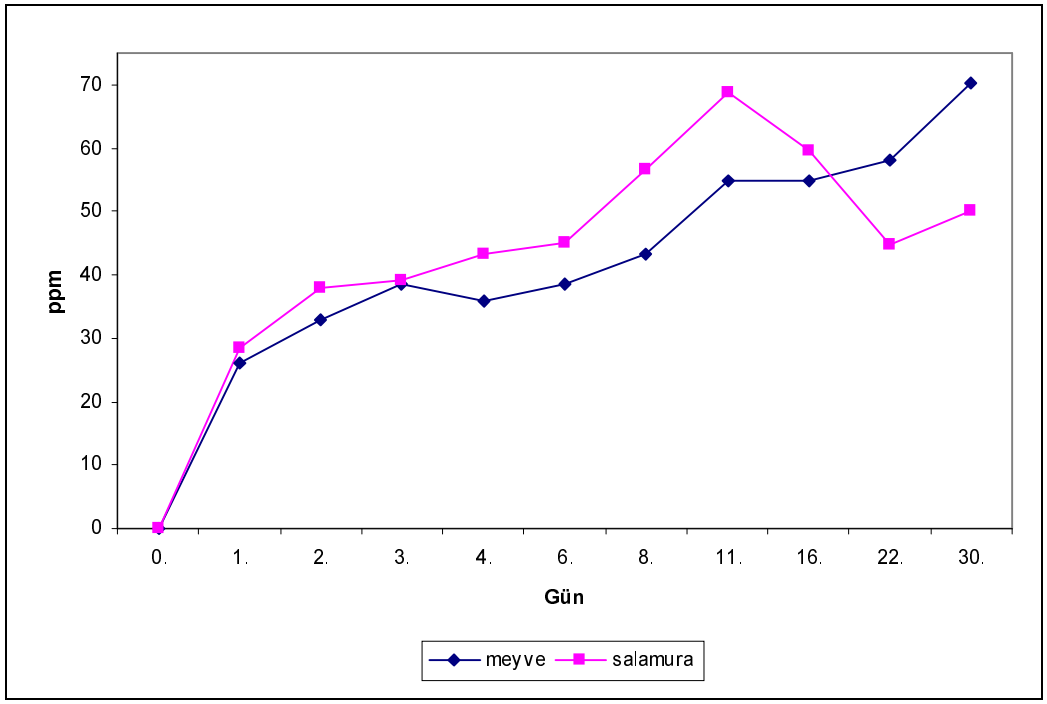
Çizelge 4.13 Kontrol ve starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularındaki toplam biyojen amin miktarları

Gün	TOPLAM BİYOJEN AMİN				Gün
	Starter[1)]		Kontrol[1)]		
	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	Meyve (µg/mg)	Salamura (µg/mL)	
0.	ND	ND	ND	ND	0.
1.	ND	ND	26,018	28,385	1.
2.	ND	ND	32,784	37,857	2.
3.	7,180 b	9,049 b	38,391 c	39,138 d	3.
4.	7,736 b	12,895 a	35,784 d	43,234 c	4.
6.	8,804 ab	13,647 a	38,435 c	45,160 c	6.
8.	10,174 a	12,826 a	43,134 b	56,710 b	8.
10.	10,367 a	12,289 a	54,713 a	68,773 a	11.
12.	11,189	21,791	54,750 y	59,695 x	16.
			58,151 y	44,911 z	22.
			70,354 x	50,111 y	30.

(n=6)
ND: Belirlenemedi
[1)] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (P<0,01).



Şekil 4.8 Starter ilave edilen örneklerin toplam biyojen amin değerleri



Şekil 4.9 Doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinin toplam biyojen amin değerleri

Toplam biyojen amin miktarları bakımından yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Ayrıca kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizleri sonunda toplam biyojen amin miktarları için ortamlar ve günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

Starter ilave edilerek üretilen hıyar turşusu örneklerinde fermantasyon süresince oluşan toplam biyojen amin miktarları ile TMAB sayısı ve pH değerleri arasındaki ilişki % 5 düzeyinde önemli bulunurken; kontrol örneklerinde TMAB, LAB, maya sayıları ile pH ve titrasyon asitliği değerleri arasındaki ilişki % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Kontrol ve starter katkılı turşu örnekleri için belirlenen toplam biyojen amin miktarlarının, toksik limit olan 100-200 mg/kg toplam biyojen amin (Nout 1994) değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ

1 *Lactobacillus plantarum* starter kültürü kullanılarak gerçekleştirilen hıyar turşusu fermantasyonu 12. günde; doğal fermantasyon yoluyla gerçekleştirilen hıyar turşusu fermantasyonu ise 30. günde sonlandırılmıştır. Fermantasyon sonunda starter katkılı örneklerde pH 3,43, titrasyon asitliği % 0,88 ve tuz konsantrasyonu % 4,15 olarak belirlenirken; starter ilave edilmeden üretilen kontrol örneklerinde ise pH 3,45, titrasyon asitliği % 0,98 ve tuz konsantrasyonu % 4,20 olarak saptanmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucuna göre iki grup arasında pH, titrasyon asitliği ve tuz değerleri bakımından günlere göre farklılığın istatistiki olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0,01$). TSE' de belirlenen tuz ve titrasyon asitliği değerleri, artaştırmada elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında her iki grupta elde edilen tuz miktarları TSE' ye uygun bulunurken; titrasyon asitliği değerlerinin starterli örneklerde TSE' de istenilen değerlerin altında, kontrol örneklerinde ise daha yakın değerlerde olduğu anlaşılmıştır.

2 Laktik asit bakteri (LAB) sayısı bakımından varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalar sonunda Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Gruplar arasındaki farkın günlere göre değiştiği, hatta 4. güne kadar önemli bir fark gözlenirken, 4. günden itibaren fark görülmediği tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günleri karşılaştırılmış (Çizelge 4.3) ve LAB sayısı bakımından yapılan varyans analizi sonunda gün ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0,05$).

3 Kontrol ve starter ilave edilerek üretilen turşuların toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) değerleri ortalamaları arasındaki farkların hem gruplara, hem de günlere göre değiştiği ve bu farkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

4 Maya sayısı bakımından kontrol örnekleri ile starter ilave edilen örneklerin ortalamaları arasında bir fark gözlenmezken, günler arasında izlenen değişimin

istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır (P<0,01). Küf, enterobakteri ve koliform sayım sonuçları yapılan 3 tekerrürün tümünde 1 log kob/mL' den düşük bulunmuştur.

5 Starter katılan örneklerde 3. günden itibaren biyojen amin oluşumu başlamış ve meyvede 2,273 µg/mg FEA' nin, salamurada 2,941 µg/mL PUT' nin diğer biyojen aminlere oranla daha yüksek miktarda oluştuğu gözlenmiştir (Çizelge 4.6, Çizelge 4.7). Kontrol örneklerinde 1. günden başlayarak biyojen amin oluşumu gözlenmiş ve meyvede 10,676 µg/mg, salamurada ise 12,887 µg/mL FEA' nin diğer biyojen aminlere göre yüksek miktarda oluştuğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

6 Fermantasyon süresince pH' nın azalması; starter katkılı örneklerde TRP ve FEA miktarlarını % 5, kontrol örneklerinde ise TRP, FEA ve PUT miktarlarını % 1 düzeyinde etkilemiştir. Titrasyon asitliği değerlerinin fermantasyon süresince artması, sadece kontrol örneklerinde TRP ve FEA oluşumunu etkilemiş ve bu etkinin % 1 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Tuz konsantrasyonu sadece starter katkılı örneklerde TRA oluşumunu etkilemiş ve bu etki % 5 düzeyinde bulunmuştur.

7 Denemede kullanılan *Lactobacillus plantarum* 11B' nin biyojen amin oluşturma yeteneği incelenmiş ve yapılan analiz sonucunda starter kültürün oluşturduğu toplam biyojen amin miktarının 0,413 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneklerinde laktik asit bakterilerinin, TRP ve HIS oluşumunu % 5, FEA ve PUT oluşumunu ise % 1 düzeyinde etkilediği, starter katkılı örneklerde ise ilave edilen starter kültürün etkisiyle biyojen amin oluşumunu baskıladığı görülmüştür.

8 TMAB sayısındaki artış, starterli örneklerde PUT ve KAD oluşumunu % 5 düzeyinde etkilerken; kontrol örneklerinde TRP ve HIS oluşumunu % 5, FEA ve PUT oluşumunu ise % 1 düzeyinde etkilemiştir.

9 Fermantasyon süresince maya sayısında meydana gelen değişimlerin sadece kontrol örneklerinde TRP, FEA ve PUT miktarlarını % 1, SPM miktarını ise % 5 düzeyinde etkilediği belirlenmiştir. Mayalarda dekarboksilaz enziminin bulunmamasına karşın asitliğe katkıları nedeniyle biyojen amin oluşumunu dolaylı olarak etkiledikleri anlaşılmıştır.

10 TRP, FEA, PUT ve HIS için yapılan varyans analizleri sonucunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve bu önemin % 1 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. KAD için gruplar arasında bir farklılık gözlenmezken, günlere göre olan değişimin % 5 düzeyinde; TRA ve SPM için ise gruplar arasındaki farkın % 1 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır. SPD oluşumuna meyve, salamura, grup, gün veya kimyasal ve mikrobiyolojik bulguların herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

11 Kontrol örneklerinde 16, 22 ve 30. günlerde yapılan varyans analizlerine göre; Meyve ve Salamura X Gün interaksiyonu TRP' de % 5, FEA, PUT ve HIS ise % 1 düzeyinde önemli bulunurken, KAD, TRA, SPD ve SPM için meyve, salamura ve günlere göre olan değişimin önemli olmadığı belirlenmiştir.

12 Toplam biyojen amin miktarları bakımından yapılan varyans analizleri sonunda Meyve ve Salamura X Grup (starter katkılı ve kontrol) X Gün interaksiyonunun ve kontrol örneklerinde fermantasyonun 16, 22 ve 30. günlerinde yapılan varyans analizlerine göre toplam biyojen amin miktarları için ortamlar ve günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

13 Starter ilave edilerek üretilen hıyar turşusu örneklerinde fermantasyon süresince oluşan toplam biyojen amin miktarları ile TMAB sayısı ve pH değerleri arasındaki ilişki % 5 düzeyinde önemli bulunurken; kontrol örneklerinde TMAB, LAB, maya sayıları ile pH ve titrasyon asitliği değerleri arasındaki ilişki % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre starter katılan örneklerde en yüksek miktarda bulunan biyojen aminler, sırasıyla, PUT, FEA ve TRP; kontrol örneklerinde ise, sırasıyla, FEA, PUT ve TRP' dir. Diğer yandan SPM ve HIS düzeylerinin, doğal fermantasyonla üretilen kontrol örneklerinde starter katılarak üretilen hıyar turşularına oranla daha yüksek miktarlarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.12). Toksik limitler (30 mg/kg FEA, 396 mg/kg PUT, 50-100 mg/kg HIS, 100-800 mg/kg TRA ve 100-200 mg/kg toplam biyojen amin) açısından kontrol ve starter katkılı turşu örneklerinin meyvelerinde ve salamuralarında belirlenen; kontrol örneklerindeki feniletilamin miktarları hariç, feniletilamin, putresin, histamin, tiramin ve toplam biyojen amin miktarlarının toksik limitlerin altında olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.13). Buna göre turşu fermantasyonu ile ilgili yapılacak çalışmalarda biyojen amin olarak özellikle PUT, FEA ve TRP düzeylerinin belirlenmesi önerilebilir.

Bilindiği gibi biyojen amin oluşumunda hammadde, hijyen, sıcaklık, üretim koşulları ve starter kültür seçimi gibi pek çok faktör etkilidir. Literatür verilerine göre *L. plantarum* 11B suşu ile yapılan hıyar turşusu denemeleri dikkate alındığında her ne kadar pH ve titrasyon asitliği gibi kimyasal özellikler açısından fermantasyona olumlu katkıda bulunduğu (Ulu 2001) ve TSE' de verilen değerlere uygun son ürün eldesi sağladığı ifade edilmekle beraber, bizim denememizde aynı suşun bu araştırmalarda saptanan değerlere ulaşamadığı görülmektedir. Buna karşın araştırmamızda *L. plantarum* 11B suşunun biyojen amin üretme yeteneği açısından negatif özellik taşıdığı ve biyojen amin oluşumunu baskıladığı saptanmış olup, hıyar turşusu üretiminde starter kültür olarak kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Akbaş, L. G. 2006. Değişik turşularda biyojen amin miktarları üzerine araştırma. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 96 s., Ankara.

Anonim. 1993. Hıyar turşusu standardı. TS 11112. 13 sayfa, TSE, Ankara.

Anonymous. 1990. Oxoid Manual, Unipath LTD., Basingstonc, Hampshire, England.

Anonymous. 1996. Merck Manual, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.

Anonymous. 2006. Our biogenic amines research - a short tour. http://home.zf.jcu.cz/~krizek/ba-gb/ba-gb.html. Erişim Tarihi: 04.01.2006.

Ansorena, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., Raemaekers, M. and Demeyer, D. 2002. Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. Meat Sci., 61 (2); 141-147.

Ayhan, K., Kolsarıcı, N. and Ozkan, G. 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. Meat Sci., 53 (3); 183-188.

Ayhan, K., Özkan, G. and Noveir, M.R. 2000. Determination of histidine decarboxylase activity produced by *Enterobacteriaceae* isolated from ground meat. Ciencia, 8 (2); 243-250.

Aytaç, S.A., Vural, H. ve Özbaş, Z.Y. 1997. *Morganella morganii* ve *Proteus vulgaris* ile histamin oluşumuna etki eden çeşitli parametrelerin incelenmesi. Kükem Dergisi, 20 (1); 19-30.

Aytac, S.A., Ozbas, Z.Y. and Vural, H. 2000. Effects of irradiation, antimicrobial agents and modified-atmosphere packaging on histamine production by *Morganella morganii* in mackerel fillets. Arch. Lebensmittelhyg., 51; 28-30.

Bodmer, S., Imark, C. and Kneubühl, M. 1999. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. Inflamm. Res., 48; 296-300.

Bozkurt, H. 2006. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. Meat Sci., (in ppress).

Bruna, J.M, Hierro, E.M., De la Hoz, I., Mottram, D.S., Fernandez, M. and Ordonez, J.A. 2003. Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol., 85 (1-2); 111-125.

Bütikofer, U., Funchs, D., Hurni, D. und Bosset, J.O. 1990. Bestimmung biogener amine in kase. Mitteilungen dee gebiete der lebensmittelhygine, 81; 120-133.

Cantoni, C. 1995. Amines in Italian meat products. Ind. Aliment-Italy, 34 (333); 9-12.

Cosansu, S. and Ayhan, K. 2002. Biogenic amine contents of Turkish soudjouck (sucuk) samples. 48th International Meat Science and Technology Congress. 25-30 August 2002, Rome, Italy, (Poster no: P9/6).

Çalış, S. ve Akbulut, N. 1992. Tatlı ve tatlı-ekşi turşuların özellikleri üzerine bir araştırma. Gıda, 17 (6); 399-403.

Çalış, S. ve Akbulut, N. 1993. Hıyar, lahana, biber, havuç ve domates turşularının özellikleri üzerine bir araştırma. Gıda, 18 (3); 207-213.

Durlu-Ozkaya, F., Alichanidis, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tunail, N. 1999. Determination of biogenic amine content of Beyaz cheese and biogenic amine productionability of some lactic acid bacteria. Milchwissenschaft, 54 (12); 680-682.

Durlu-Ozkaya, F., Ayhan, K. and Ozkan, G. 2000. Biogenic amine determination of Tulum Cheese by HPLC. Milcwissenschaft, 55 (1); 27-28.

Durlu-Özkaya, F. 2001. Salamura beyaz peynirlerden izole edilen bazı Laktokok, Enterokok ve Laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılmaları. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 134 s., Ankara.

Durlu-Ozkaya, F., Ayhan, K. and Vural, N. 2001. Determination of biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. Meat Sci., 58 (2); 163-166.

Durlu-Ozkaya, F. 2002. Biogenic amine content of some Turkish cheeses. J. Food Process. Pres., 26 (4); 259-265.

Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları II) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 1021, Ankara Üniversitesi Basımevi, 381 s., Ankara.

Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. J. AOAC Int., 76 (3); 575-577.

Ekici, K. and Coskun, H. 2004. Histamine contents of some commercial vegetable pickles. Pakistan Journal of Nutrition, 3 (3); 197-198.

Erkmen, O. and Bozkurt, H. 2004. Quality characteristics of retailed sucuk (Turkish dry-fermented sausage). Food Technol. Biotechnol., 42 (1); 63-69.

Faeth, K.P. and Radler, F. 1994. Investigation of the formation of amines by lactic acid bacteria. Wein-Wissenschaft, 49 (1); 11-16.

Fleming, H.P., Thompson, R.L., Etchells, J.L., Kelling, R.E. and Bell, T.A. 1973a. Bloater formation in brined cucumbers fermented by *Lactobacillus plantarum*. J. Food Sci., 38; 499-503.

Fleming, H.P., Thompson, R.L., Etchells, J.L., Kelling, R.E. and Bell, T.A. 1973b. Carbon dioxide production in the fermentation of brined cucumbers. J. Food Sci., 38; 504-506.

Fleming, H.P., McDonald, L.C., McFeeters, R.F., Thompson, R.L. and Humphries, E.G. 1995. Fermentation of cucumbers without sodium chloride. J. Food Sci., 60 (2); 312-315.

García-García, P., Brenes-Balbuena, M., Romero-Brink, C. and Garrido-Fernández, A. 2001. Biogenic amines in packed table olives and pickles. J. Food Protect., 64 (3); 374-378.

Gennaro, M.C., Gianotti, V., Marengo, E., Pattono, D. and Turi, R.M. 2003. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). Food Chem., 82 (4); 545-551.

Gonzalez-Fernandez, C., Santos, E.M., Jaime, I. and Rovira, J. 2003. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. Food Microbiol., 20 (3); 275-284.

Halász, A., Baráth, A., Simon-Sakardi, L. and Holzapfel, W.H. 1994. Biogenic amines and their production bymicroorganisms in food. Trends Food Sci. Technol., 5; 42-49. In "Yücel, U., Üren, A., Hocalar, B. ve Turantaş, F. 2001. Fermente ürünlerden peynir, şarap ve lahana turşularında histamin miktarları. TÜBİTAK-TOGTAG Proje no. 1726, s. 1-25, Mayıs, İzmir."

Halász, A., Baráth, A. and Holzapfel, W.H. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. Z Lebensm Unters Forsch A, 208; 434-438.

Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Vecina-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C. 1997a. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. J. Agr. Food Chem., 45; 2098-2102.

Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Vecina-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C. 1997b. Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. J. Food Protect., 60 (7); 825-830.

Hornero-Méndez, D. and Garrido-Fernández, A. 1997. Rapid high-performance liquid chromatography analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. J. Food Protect., 60 (4); 414-419.

Hwang, D.F., Chang, S.C., Shiau, C.Y. and Cheng, C.C. 1995. Biogenic amines in the flesh of sailfish (Istiophourus playpterus) responsible for scrombroid poisoning. J. Food Sci., 60 (5); 926-928.

İç, E. ve Özçelik, F. 1995. Hıyar turşusu fermantasyonunda görülen mikroorganizmalar. Gıda, 20 (3); 173-178.

İç, E. 2000. Hıyar turşusu salamurasında kalsiyum klorür kullanarak tuz konsantrasyonunun azaltılma olanağı üzerine araştırma. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 117 s., Ankara.

Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., Steidlová, Š. and Pelikánová, T. 1999. Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. Food Chem., 67; 275-280.

Kalač, P., Špička, J., Křížek, M. and Pelikánová, T. 2000a. The effects of lactic aid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. Food Chem., 70; 355-359.

Kalač, P., Špička, J., Křížek, M. and Pelikánová, T. 2000b. Changes in biogenic amine concentration during sauerkraut storage. Food Chem., 69; 309-314.

Kalač, P. 2006. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. Meat Sci., 73; 1-11.

Karacakol, M. 1998. Düşük tuzlu veya tuz içermeyen salamurada hıyar turşusu üretimi. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 44 s., Ankara.

Kirschbaum, J., Rebscher, K. and Brückner, H. 2000. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. J. Chromatogr. A, 881; 517-530.

Komprda, T., Neznalova, J., Standara, S. and Bover-Cid, S. 2001. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage polican. Meat Sci., 59 (3); 267-276.

Komprda, T., Smělá, D., Pechová, P., Kalhotka, L., Štenel, J. And Klejdus, B. 2004. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. Meat Sci. 67; 607-616.

Křížek, M. and Pelikánová, T. 1998. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr. A, 815; 243-250.

Kuensch, U., Schaerer, H. and Temperli, A. 1989. Study on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation. Poster presented at the International Conference on Biotechnology and Food, Feb. 20-24, 1989, Holienheim University, Stuttgart. In "Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int., 29 (7); 675-690."

Lange, J., Thomas, K. and Wittmann, C. 2002. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. J. Chromatogr. B, 779; 229-239.

Maijala, R. and Eerola, S. 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. Meat Sci., 35 (3); 387-395.

Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P. and Hirvi, T. 1995a. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages. J. Food Sci. 60 (6); 1187-1190.

Maijala, R., Nurmi, E. and Fischer, A. 1995b. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. Meat Sci. 39 (1); 9-22.

McCabe-Sellers, B.J., Staggs, C.G. and Bogle, M.L. 2006. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. Journal of Food Composition and Analysis. (in press).

McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Daeschel, M.A. 1991. Acidification effects on microbial populations during initiation of cucumber fermentation. J. Food Sci., 56 (5); 1353-1359.

Moret, S., Bortolomeazzi, R. and Lercker, G. 1992. Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination. J. Chromatogr., 591; 175-180.

Moret, S. and Conte, L.S. 1996. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food chararcteristics. J. Chromatogr. A, 729; 363-369.

Moret, S., Smela, D., Populin, T. and Conte, L.S. 2005. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. Food Chem., 89; 355-361.

Nout, M.J.R. 1994. Fermented foods and food safety. Food Res. Int., 29; 675-690. In "Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., Steidlová, Š. and Pelikánová, T. 1999. Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. Food Chem., 67; 275-280."

Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Trujillo-Mesa, A.J. and Vidal-Carou, M.C. 2002. Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. J. Food Sci., 67 (8); 2940-2944.

Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. 2003. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. J. Food Sci., 68 (3); 750-755.

Ogabi, F. ve Pamir, M.H. 1973. Türk turşuları üzerinde araştırmalar. II. Turşu kurma tekniklerinin ve turşu çeşitlerinin fermantasyonun gidişi ve bununla ilgili olarak laktik asit bakterilerinin çoğalmaları üzerine etkileri. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, 23; 317-367.

Özçelik, F. ve İç, E. 1996. Hıyar turşusu üretiminde kontrollü fermantasyon. Gıda, 21 (1); 49-53.

Özçelik, F., İç, E. ve Yıldız, Ş. 1998. Hıyar turşusu üretiminde pH stabilitesinin fermantasyon üzerine etkisi. Gıda, 23; 87-95.

Özçelik, F., Yıldırır, M. ve İç, E. 2001. Hıyar turşusu fermantasyonunda şişme zararını önlemek için salamuradan CO_2' in uzaklaştırılması. Gıda, 26 (5); 323-329.

Özçelik, F. ve Ulu, T. 2002. Depolanmış hıyar turşularının kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine pH' nın etkisi. Gıda, 27 (3); 169-176.

Rodrigo, M., Lazaro, M.J., Garcia, G., Conesa, F. and Safon, J. 1992. Pilot study of cucumber fermentation: diffusing gases and bloater damage. J. Food Sci., 57 (1); 155-160.

Sagun, E., Ekici, K. and Durmaz, H. 2005. The formation of histamine in herby cheese during ripening. J. Food Quality, 28 (2); 171-178.

Schneller, R., Good, P. and Jenny, M. 1997. Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine conentrations in semi-soft cheeses during ripening. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 204; 265-272.

Shakila, R.J., Vasundhara, T.S. and Kumudavally, K.V. 2001. A comparison of the TLC - dansitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. Food Chem., 75; 255-259.

Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int., 29 (7); 675-690.

Silla-Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol., 29; 213-231.

Špička, J., Kalač, P., Bover-Cid, S. and Křížek, M. 2002. Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. Eur. Food Res. Technol., 215; 509-514.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. J. Food Protect., 54 (6); 460-470.

Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. and Hammes, W.P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. Zeitschrift-fuer-Lebensmittel-Lintersuchung-und Forschung, 201 (1); 79-82.

Sumner, S.S. and Taylor, S.L. 1989. Detection method for histamine-producing, dairy bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. J. Food Protect., 52 (2); 105-108.

Şahin, İ. ve Akbaş, H. 2001. Hıyar turşularında yumuşamanın önlenmesi ve kullanılabilecek kalsiyum klorür ($CaCl_2$) miktarının belirlenmesi. Gıda, 26 (5); 333-338.

ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis in't Veld, J.H.J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol., 11; 73-84.

Ulu, T. 2001. Hıyar turşularının depolanma stabilitesi üzerine pH' nın etkisi. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 47 s., Ankara.

Yücel, U., Üren, A., Hocalar, B. ve Turantaş, F. 2001. Fermente ürünlerden peynir, şarap ve lahana turşularında histamin miktarları. TÜBİTAK-TOGTAG Proje no. 1726, s. 1-25, Mayıs, İzmir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep TURGUT

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Fatih Sultan Mehmet Lisesi, Ankara, 1994-1997

Lisans: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara, 1998-2002

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2003-2006