

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**BAZI MEYVELERDEN ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAKİ
BİYOJEN AMİNLERİN TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fırat TOK

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin KARACA SANYÜREK

TUNCELİ – 2020

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BAZI MEYVELERDEN ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAKİ
BİYOJEN AMİNLERİN TESPİTİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fırat TOK
(10874048)

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin KARACA SANYÜREK

TUNCELİ – 2020

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BAZI MEYVELERDEN ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAKİ
BİYOJEN AMİNLERİN TESPİTİ**

Fırat TOK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez / / 2020 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza:

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin
K.SANYÜREK
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza:

Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

İmza:

Dr. Öğr. Üyesi Sevinç
AYDIN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Olcay KAPLAN İNCE
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. **Proje No:** YLMUB018-10

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu” nda ki hükümlere tabidir.

ÖZET

Biyojen aminlerin neden olduğu zehirlenmelerden en sık görüleni, histamin ve tiramin zehirlenmesidir. Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri düşünüldüğünde, şaraplardaki biyojen aminlerin belirlenmesinin önemi de anlaşılmaktadır. Biyojen aminler, birçok gıdada doğal olarak bulunan veya mikrobiyal faaliyet sonucu oluşan organik bileşenlerdir. Şaraplarda biyojen aminlerin varlığı ve bunların toksikolojik etkileri sağlık açısından önemli bir sorun oluşturabilmektedir. Biyojen aminlerin insan vücudunda bazı metabolik görevleri olmasına rağmen yüksek miktarda tüketildiğinde insan sağlığına zarar verebilirler. Bu çalışma, piyasadan temin edilen 10 farklı meyve şaraplarındaki (nar, karadut, vişne, kavun, çilek, böğürtlen, yaban mersini) amino asitlerin dekarboksilasyonları yoluyla oluşan biyojen aminler incelenmiştir. Piyasadan temin edilen 2'şer adet vişne, çilek, karadut ve 1'er adet yaban mersini, nar, böğürtlen, kavun şaraplarını yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında 340 nm (uyarma) ve 420 nm (emisyon) dalga boylarında floresans detektör ile biyojen amin analizi gerçekleştirilmiştir. En yüksek putresin değeri 11,72 mg/L ile çilek şarabında tespit edilmiştir. En yüksek histamin değeri 5,68 mg/L ile yine çilek şarabında tespit edilmiştir. Bütün şarap örneklerinde kadaverin, feniletilamin ve triptamin tespit edilmemiştir. Toplam biyojen amin içeriği olarak en yüksek değer 53,96 mg/L ile böğürtlen şarabında en düşük değer ise 11,62 mg/L ile yaban mersini şarabında görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Meyve şarabı, Biyojen aminler, HPLC, Dekarboksilasyon

ABSTRACT

Detection of Biogenic Amines in Wines Obtained From Fruits

The most common poisoning caused by biogenic amines is histamine and tyramine poisoning. Given the toxicological effects of biogenic amines, the importance of identifying biogenic amines in wines is also understood. Biogenic amines are organic compounds that are naturally found in many foods or are formed as a result of microbial activity. The presence of biogenic amines in wine and their toxicological effects may pose an important health problem. Although biogenic amines have some metabolic functions in the human body, they can harm human health when consumed in high amounts. In this study, biogenic amines formed by decarboxylation of amino acids in 10 different fruit wines (pomegranate, black mulberry, cherry, melon, strawberry, blackberry, blueberry) were investigated. Biogenic amine analysis was carried out by using fluorescence detector at 340 nm (excitation) and 420 nm (emission) in high performance liquid chromatography (HPLC) device in some commercially available wines. The highest amount of histamine and putresin was determined in strawberry wine with 5.68 mg/l and 11.72 mg/l, respectively. Cadaver, phenylethylamine and triptamine were not detected in all wine samples. The highest value in total biogenic amine content was observed in blackberry wine with 53.96 mg / l and the lowest value was in blueberry wine with 11.62 mg/l.

Keywords: Fruit wine, Biogenic amines, HPLC, Decarboxylation

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, bilgi ve tecrübesiyle benimle paylaşan, daha önce araştırılmış bir konudan özgün bir çalışma ortaya çıkartılmasını sağlayan, saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nesrin KARACA SANYÜREK'e, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, desteklerini ve iyiliklerini esirgemeyen canım aileme, çalışma süresince gece gündüz tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Cansu TOK'a ve son olarak sabırlı bir şekilde desteklerini sunan çalışmakta olduğum işyeri müdürüm sayın Düzgün ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fırat TOK
TUNCELİ - 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	II
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜRLER.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Şarap Çeşitleri	6
1.1.1. Meyve Şarapları Üzerine Yapılan Çalışmalar	10
1.2. Biyojen Amin Oluşumu.....	12
1.2.1. pH	17
1.2.2. Sıcaklık	18
1.2.3. Tuz.....	18
1.2.4. Starter Kültürler	19
1.2.5. Oksijen.....	20
1.3. Gıdalarda Bulunan Biyojen Aminler	20
1.3.1. Et ve Et Ürünleri.....	21
1.3.2. Balık ve Ürünleri	23
1.3.3. Peynir.....	24
1.3.4. Meyve ve Sebzeler.....	27
1.3.5. Şarap	29
2. MATERYAL VE METOT	31
2.1. Materyal.....	31
2.2. Metot.....	31
2.2.1. Borat tamponu.....	31
2.2.2. O-fitaldialdehit	31
2.2.3. Asetat Tamponu.....	31
2.2.4. Mobil Faz.....	32
2.2.5. Cihaz Koşulları	32
2.2.6. Standart Hazırlama	32
2.2.7. Numune ve standart Çalışma	32
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1. Histamin	36
3.2. Putresin	37
3.3. Tiramin	37
3.4. Kadaverin, Feniletılamin ve Triptamin	38
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR.....	40
EKLER	47

SEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Şarap üretim prosesi.....	8
Şekil 1.2. Aminoasit dekarboksilasyonu, aldehit aminasyonu ve keton transaminasyonu.....	13
Şekil 1.3. Biyojen aminlerin kimyasal formülleri	14
Şekil 1.4. Biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu	16



TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Kimyasal yapılarına göre biyojen aminler.....	15
Tablo 1.2. İçerdikleri azot sayılarına göre biyojen aminler.....	15
Tablo 1.3. Et ürünlerindeki biyojen aminler.....	22
Tablo 1.4. Farklı peynirlerdeki biyojen aminler.....	27
Tablo 2.1. Mobil faz gradient programı.....	32
Tablo 3.1. Şaraplarda tespit edilen biyojen aminler.....	33



SEMBOLLER LİSTESİ

°C	: Santigrat
CO₂	: Karbondioksit
CNBF	: 4-Kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür
CH₃CH₂OH	: Etil alkol



KISALTMALAR LİSTESİ

AB	: Avrupa Birliği
KE	: Kapiller Elektroforez
DAO	: Di Amin Oksidaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNS-CL	: Dansil Klorür
EFSA	: European Food Safety Authority
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Sıvı Kromatografisi
kg	: Kilogram
L	: Litre
MAO	: Mono Amin Oksidaz
nm	: Nanometre
OPA	: Ortofitaldialdehit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultraviole
μ	: Mikron

1. GİRİŞ

Üzümlerin sıkılarak fermantasyona bırakılması şarap olarak adlandırılır. Şeker içeren her meyveden şarap elde edilmesi mümkündür ve şarap işlendiği meyvenin adını alır. Meyve şarapları, üzümünden farklı meyvelerden üretilirler. Bunlardan bazıları elma şarabı, armut şarabı, erik şarabı, vişne şarabı, kayısı şarabı, nar şarabı ve çeşitli üzüksü meyvelerden (ahududu, böğürtlen, yaban mersini, karadut) elde edilen şaraplardır. Şarap üretmek için meyvenin fermantasyonu eski zamanlardan beri Mısır ve Yunan yazılarında elde edilir. Şarap üretimin büyük çoğunluğu üzüm suyunun fermantasyona bırakılmasıyla yapılmıştır ancak üzüm dışındaki meyvelerinde fermantasyonuna yaygın olarak uygulandığına şüphe yoktur (Avrupa Topluluğu, 2011).

Üzüm yetiştiriciliğinin iklim koşulları nedeniyle sınırlı olduğu alanlarda şarap, diğer meyve ve meyve sularının fermantasyonu sonucu da üretilmiştir. Şarap üretimi sırasında üzümün yapısı nedeniyle şeker, asit, enzim veya diğer besin maddelerini eklemeyen fermantasyona uğrayabilmesinden dolayı doğal kimyasal dengesi nedeniyle tercih edilir. Bununla birlikte, şarap üretiminde çilek, vişne, kiraz, kavun, ananas ve diğer meyveler kullanılır (Obaado ve ark., 2009).

Çok eskiden günümüze kadar meyve şarapları üretilmektedir. Meyve şarapları ile üzüm şarapları arasında üretim farkı vardır. Hammaddenin değişik olması en büyük farklardan biridir. Meyve sularının sulandırılması, tatlandırılması, fermantasyon ve eskitme uygulamalarının kendine has uygulanması da diğer farklılıklardır. Soğuk iklimli ülkelerde meyve şarapları endüstriyel önem taşır. İngiltere ve Fransa'da elma ve armut şarabı önemli meyve şaraplarındandır. Danimarka'da alkol ile güçlendirilmiş frenk üzümü ve vişne şarapları elde edilmektedir. Amerika'nın doğu kısımlarında elma, kiraz, böğürtlen ve yaban mersini şarapları üretilmektedir (Anlı ve ark., 2004).

Meyve şarapları üretildikleri meyvenin rengini ve tadını içermelidir. Tatlı ve lezzetlidir. Meyve şarabı üretiminde bileşim maddeleri itibarıyla dengeli bir şarap üretimine üzüm kadar uygun olmadığı için su, şeker ve organik asit eklenir. Vişne şarabı yapılırken asitliği ayarlamak için su ve şeker eklenir, kayısı şarabı üretilirken viskozite kazandırmak için su, şeker ve hatta bazı durumlarda asit katkısı yapılmaktadır. Eklenen malzemeler meyve şarabın özelliklerine elverişli olacak şekilde tayin edilmektedir.

Meyve şaraplarında genellikle alkol oranları %10-%12 arasındadır. Aynı meyveden elde edilmiş damıtık alkol ile güçlendirildiklerinde alkol oranı %20 seviyelerine ulaşabilir. Elma ve armut şaraplarının alkol oranı eğer kuvvetlendirme yapılmadı ise genellikle %2 ile %8 arasındadır (Obaedo ve ark., 2009).

Şaraplarda biyojen aminlerin varlığı, tüketicinin korunmasına artan ilginin bir sonucu olarak, 30 yıldır ve özellikle son 10 yılda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Şaraplarda biyojen amin çalışması iki nedenden dolayı ilgi çekicidir: Biyojen amin içeriği ile ilişkili toksikolojik risk ve şarapçılık sürecinde meydana gelen hijyenik sıhhi koşulların değerlendirilmesidir. Biyojen aminler düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir. Serbest amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehitler ve ketonların aminasyonu veya transaminasyonu ile oluşurlar. Biyojen aminler, ilgili fizyolojik aktivitelere sahip biyoaktif bileşikler olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonların tüketimi insan sağlığına etki eder ve baş ağrısı, hipo veya hipertansiyon, böbrek yetmezliği, anafilaktik şok ve hatta ölüm gibi çeşitli problemlere neden olabilir. Bu tür olumsuz etkilere maruz kalma riski alkollü içeceklerin tüketimi ile artar (Anlı ve ark., 2004).

Bu nedenlerle, biyojen aminler dünya çapında bir endişe haline gelmiştir ve fermente gıda ürünlerinde yaygınlığını azaltmak için çeşitli çabalar gösterilmiştir (Avrupa Topluluğu, 2011).

Dünya çapınca yılda 1950 milyon hektolitreye bira ve 243 milyon hektolitreye şarap tüketimi ile yüksek kaliteli ürünlere yönelik tüketici talepleriyle birlikte, üreticileri hem kalite hem de gıda güvenliğini garanti etmeye zorlamıştır. Bu nedenle, bira ve şarapta biyojen aminlerin içeriğini kontrol etmek, ekonomik ve gıda güvenliği sorunlarından kaçınmak için önemlidir. Biyojen amin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kılcal elektroforez (KE), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ve gaz kromatografisi (GC) dahil çeşitli analitik yöntemler bildirilmiştir HPLC, şarap ve biralarda biyojen amin tayininde en yaygın kullanılan tekniktir, ancak ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) mevcut HPLC yöntemlerini iyileştirmek için güçlü bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. UHPLC ile daha yüksek çözünürlük, daha iyi tespit kabiliyeti ve daha kısa analiz süresi elde etmek mümkündür (Latorre-Moratalla ve ark., 2010).

BA tespiti için en yaygın problemlerden biri, görünür UV Emilimi veya Floresan (FLD) ile tatmin edici bir tespiti sağlayan önemli kromofor gruplarının eksikliğidir. Bu

nedenle hem saptama hem de ayrılmayı geliştiren bir türevlendirme işlemi gereklidir (Ordenez ve ark., 1997).

En sık kullanılan türevlendirme reaktifleri O-ftalildialdehid (OPA), 4-kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür (CNBF), benzoil klorür, dabsil klorür ve dansil klorürdür (Dns-Cl) (Aflaki ve ark., 2014).

Dns-Cl, UV ve FLD tarafından tespit edilen kararlı türevlendirilmiş bileşikler oluşturduğu için en yaygın kullanılanlardan biridir (Galarce ve ark., 2016).

Biyojen aminler protein içeriği yüksek ve bazı fermente gıdalarda bulunurlar. Canlı hücrelerde birtakım metabolik etkenlere sahiptirler. Bu işlem canlı organizmaların mikrobiyal etkisi ile gerçekleştirildiğinde biyojen aminler olarak adlandırılırlar. Örneğin, canlıların büyümesi için poliaminler ve putresin elzemdir. Sinir sisteminin çalışmasında ve serotonin, histamin ve tiramin gereklidir. Ayrıca kan basıncının ayarlanmasında da bu aminlerin etkisi vardır. Biyojen aminlerin oluşumu fermente gıdalara, bozulmuş veya bayatlamış gıdalara bağlıdır. Amino asitlerin dekarboksilasyonu ve gıdalarda bulunan enzimler vasıtasıyla da yüksek içerikli biyojen aminler oluşmaktadır. (Ten Brink ve ark., 1990).

Biyojen aminlerin gelişimi şaraplardaki sentezleri, üzümün serbest amino asitlerinin mevcudiyeti, amino asit dekarboksilazlar ile mikroorganizmaların varlığı veya bu mikroorganizmaların enzimlerinin büyümesi ve üretimi için elverişli koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Ayrıca lösin, valin, lizin, triptofan ve treanin gibi aminoasitler üzümün yapısında bulunmaktadır (Shalaby ve ark., 1996).

Aminoasitlerin karboksil kökünün ayrılmasıyla aminoasitin amini oluşur ve dekarboksilasyon adı verilir. Enzime ise dekarboksilaz adı verilir. Hayvansal ve bitkisel dokularda bulunan enzimler dekarboksilasyonu başlatabilir. Öte yandan mikroorganizmalar da biyojen amin varlığını etkileyebilir (Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002).

Biyojen aminlerin, vücutta önemli birçok biyolojik rolleri mevcut olup protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluştururlar (Majjala ve ark.,1993). Putresin, spermin, spermidin gibi poliaminler canlı hücrelerin vazgeçilmez bileşenleridir. Ayrıca poliaminlerin, bağırsaklardaki immunolojik sistemde ve normal metabolik fonksiyonların aktivitesinin sürdürülmesinde de gerekli oldukları bildirilmiştir (Silla Santos, 1996).

Gıda maddelerinde biyojen aminlerin varlığı geleneksel olarak istenmeyen mikrobiyal aktivitenin bir göstergesi olarak gözükmemektedir ve bazı biyojen aminlerin

nispeten yüksek miktarları, gıdaların bozulması veya bunların kusurlu üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Şaraptaki biyojen amin içeriği, vinifikasyona dahil olan süreçlere, amino asidik bileşimine, mayaların ve laktik asit bakterilerinin varlığına, üzüm çeşidine ve bölgeye bağlıdır (Lange ve ark., 2002; García-Villar ve Saurina, 2006).

Yüksek miktarda biyojen amin içeren gıdalar tüketildiği zaman baş ağrısı, sindirim problemleri, bulantı ve kalp çarpıntısına neden olabilir (Silla Santos, 1996).

Biyojen aminlerden histamin zehirlenmesi için toksik sınırlar litrede 8 ile 40 mg hafif zehirlenme, 40-100 mg orta dereceli zehirlenme ve 100 mg'ın üzerinde, yoğun zehirlenme görülmektedir (Ayhan ve ark., 1999). Şaraplardaki biyojenik amin seviyelerinin bilgisi hem tüketiciler hem de üreticiler için önemlidir.

Yüksek miktarlarda biyojen amin içeren şarap gibi içeceklerde biyojen aminlerin belirlenmesi önemlidir (Kirschbaum ve ark., 1999).

Gıda maddelerinde biyojen aminler ve diğer maddeler arasında karmaşık etkileşimler meydana gelir bu nedenle bu bileşikler için maksimum sınırlar oluşturmak zordur. Ayrıca, putresin ve kadaverin gibi diaminlerin nitrit ile reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminler ürettikleri tespit edilmiştir. Gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucunda oluşan biyolojik aminler daha düşük molekül ağırlığına sahiptir. Hemen hemen tüm besinler serbest amino asitler veya proteinleri içerir. Mikrobiyal veya biyokimyasal aktivite şartları sağlandığında biyojen amin oluşumu beklenen bir olgudur (Ten Bring ve ark., 1990).

Aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu yoluyla genellikle gıdada sentezlenen azotlu bazlardır (Lange ve ark., 2002). Aminoasitlerin dekarboksilasyonu ya da aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile biyojen aminler oluşmaktadır (Zolou ve ark., 2003).

Kimyasal yapılarına göre biyojen aminler; alifatik, aromatik ve heterosiklik aminler olarak ayrılırlar. Barındırdıkları azot sayısı yüzünden monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak gruplandırılırlar. Yüksek konsantrasyonlardaki biyojenik aminler, özellikle alkol ve asetaldehit bulunduğunda, hassas insanlarda istenmeyen fizyolojik etkilere neden olabilir (Maynard ve Schenker, 1996).

Amino asitlerden karbondioksitin ayrılmasıyla bu amino asidin amini oluşmaktadır. Bu olay organizmaya özgü enzimlerle olabildiği gibi mikrobiyel olarak da gerçekleşebilmektedir. Amino asitlerden karbondioksitin ayrılmasına dekarboksilasyon, ilgili enzime de dekarboksilaz ismi verilir. İnsan vücudunda sentezlenen biyojen aminler

ayrıca gıdaların tüketilmesi ile de ortaya çıkabilmektedirler. Proteince zengin gıdalarda, meyvelerde, sebzelerde ve fermente gıdalarda biyojen aminler önemli derecede bulunmaktadır. Biyojenik aminler, temel olarak amino asitlerden, substrata özgü dekarboksilaz enzimleri yoluyla türetilir (Loukou, ve ark., 2003).

Son zamanlarda biyojen aminlerin gıdalardaki bulunuşu ve saptanması farmakolojik ve fizyolojik olarak gittikçe önem kazanmıştır (Bauza ve ark., 1995).

Putresin, Histamin, Tiramin, Kadaverin, Triptamin, Spermidin, Spermin, 2-Feniletilamin, Metilamin ve Agmatin gıdalarda bulunan çeşitli biyojen aminlerdir (Shalaby, 1996).

Fermente olmayan gıdalar fermente olan gıdalara göre daha az biyojen amin içerirler. Bunun nedeni amino asit dekarboksilaz aktivitesi barındıran mikroorganizmalar fermente gıdalarda bulunmasındandır (Shalaby, 1996).

İnsan ve hayvanlarda fizyolojik fonksiyonların sağlanmasında biyojen aminler çok önemli rol oynamaktadır. Putresin, spermidin ve spermin gibi biyojen aminler DNA, RNA ve protein sentezde önemli bir paya sahiptir. Hücre büyüme ve çoğalmasında biyojen aminlere gerek duyulmaktadır. Bunun dışında yüksek oranda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi sonucu insan ve hayvan vücudunda toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu toksikolojik etkiler sağlık açısından önemli sorun oluşturduğu için şaraplardaki biyojen amin varlığının tespit edilmesi gerekmektedir (Anlı ark., 2006).

Şaraplarda bulunan histamin ve tiraminin neden olduğu zehirlenmeler oldukça yaygındır. Biyojen aminler, örneğin peynir, sosis, fermente sebze ve şarap gibi amino asit dekarboksilasyonu gıdaların ve içeceklerin fermentasyonu sürecinde laktik asit bakterileri tarafından üretilir. Birçok bakteri amino asitleri dekarboksilate edebilmektedir. Bu reaksiyonun, pH'da bir artışa neden olması nedeniyle, asidik ortamda büyümeyi ve hayatta kalmayı desteklediği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı; HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazı kullanılarak piyasadan alınan meyve şaraplarında aminoasitlerin dekarboksilasyonu gözlenmektedir.

1.1. Şarap Çeşitleri

Tarihte ilk şarap üretiminin M.Ö. 5000 yılında keşfedildiği söylenilmektedir. İlk şarabın bilinçli olarak üretilmeyip, kendiliğinden meydana gelmiştir. Yapılan kazılarda, ilk üzüm asmasının anavatanının Asya olduğunu belirlenmiştir (Çelik ve ark., 2000).

Şarap, üzüm suyundaki glikoz ve früktozun mayalar tarafından etil alkol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ve karbondioksit (CO_2) dönüştürülmesiyle elde edilen bir alkollü içkidir. %85-90 oranında etanol içerir ve su içinde erir. Karbondioksit ise kabarcıklar halinde şaraptan ayrılır ve havaya karışır ve bu olaya fermentasyon adı verilir. Üzüm içindeki şekere ve kullanılan mayanın cinsine göre, hacmen %9-15 derece arasında alkol içeren şarap elde edilir. Taze üzümlerin bir kısmının veya tamamının ezilmiş veya üzüm şirasının etil alkol fermentasyonuna terk edilmesi sonucu elde edilen alkollü içkiye şarap denir (Anlı, 2005).

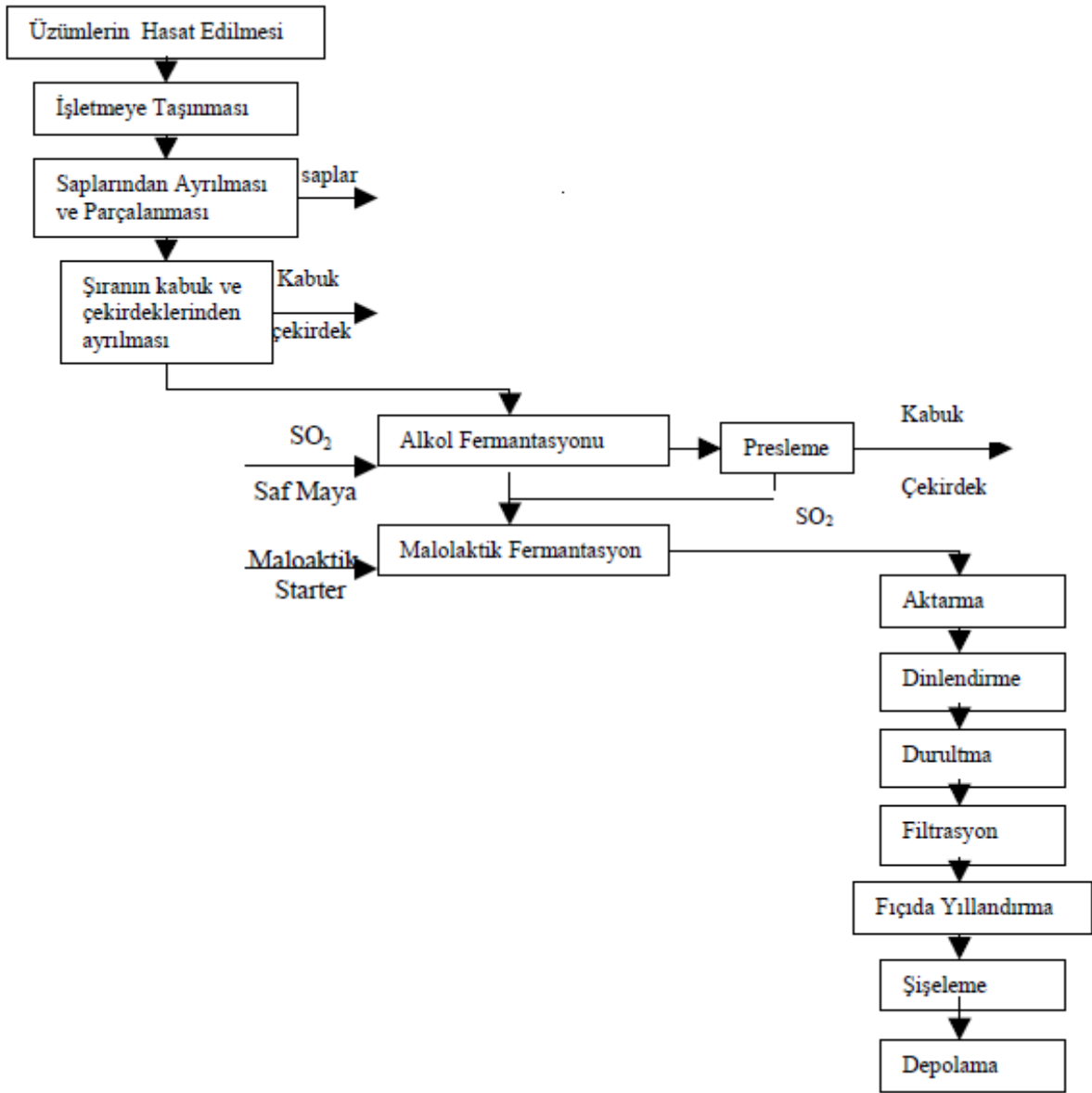
Koyu renkli üzüm çeşitlerinden kırmızı şarap elde edilir. Kırmızı şarapların rengi, üretildiği üzüme göre değişebilmektedir. Menekşe, tuğla kırmızısı ve kahve renk tonlarında kırmızı şaraplar üretilmektedir. Kırmızı şarap ile beyaz şarap arasında farklılıklar üretim metotları ile alakalıdır. Bu şaraplar farklı fermentasyonlar ile üretilmektedir. İki şarap arasındaki farkın, beyaz şarap üretiminde ki üzüm kabuğunun sıradan erken uzaklaşmış olmasıdır. Dünyada 400'den fazla üzüm çeşidi ile şarap yapılmaktadır. Dünyada tüketilen şarap miktarı kişi başına 3-4 lt olarak gerçekleşmektedir. Fransa ve İtalya gibi ileri şarap ülkelerinde kişi başına yıllık tüketim ise; 60 lt düzeyine ulaşmaktadır (Anlı, 2005).

Ülkemizde şarap tüketiminin düşük olması ve dış satımın çok az olması şarap üretimini etkilemektedir ve yıllara göre şarap üretimi azalmaktadır. Dış satımdaki artış ancak kaliteli şarap üretimi ile mümkün olur (Cabaroğlu ve ark., 1997).

Şarap, çok önceden bu yana en kıymet gören içkilerden birisi olmuştur. Milattan önceki yıllarda farklı kültürlerde ki toplulukların tören ve kutlamalar esnasında ve şarabı yaygın olarak kullandıkları bilinmektedir. Dünyada bazı üzüm çeşitleri, şaraplık kaliteleri ile ön plana çıkmıştır. Kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerine örnek olarak; Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot noir, Alicante boushet, Syrah, Gamay; kaliteli beyaz şaraplık üzüm çeşitlerine örnek olarak ise; Chardonnay, Narince, Pinot blanc, Semillion, Riesling, Viognier, Cheninblank verilebilir. Ülkemizde kaliteli kırmızı şaraplık üretiminde kullanılan üzüm çeşitleri olarak; Öküzgözü, Boğazkere, Papaz karası, Çal karası, Kalecik

ve kaliteli beyaz şaraplık üretimde kullanılan üzüm çeşitleri; Narince, Emir, Dökülgen, Misket, Sultaniye örnek gösterilebilir (Patil ve ark., 1995).

Şarap, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üzüm şekerinin alkol ve CO₂'ye dönüşümüyle gerçekleşen alkol fermantasyonu ile laktik asit bakterilerince L-malik asidin L-laktik aside dönüşmesiyle ortamda asitlik azalmasına neden olan malolaktik fermantasyon sonucu şarap üretilir. Bu işlemlerden sonra metabolik ürünlerin yanı sıra bir de ikincil ürünler ortaya çıkar. Bunlar kükürt dioksit, okratoksin-A, etil karbamat ve biyojen aminlerdir. Bu ikincil ürünler insan sağlığını etkilemektedir. Üzüm hasadı yapıldığı zaman şarap üretim yerlerine saplarından ayrılarak, temizlenerek ve ezilerek üretimin başlanması sağlanır. Şarap türüne bağlı olarak su ve üzüm posası bir birinden ayrılarak üzüm suyunun oksidasyonu ve kontaminasyonu engellemek için kükürtleme işlemi gerçekleştirilir. Şekil 1.1'de genel olarak şarap üretim prosesleri gösterilmiştir (Anlı ve ark., 2004).



Şekil 1.1. Şarap üretim prosesi (Anlı ve ark., 2004).

Üzümün yapısı ile şarap kalitesi arasında yakın bir ilişki vardır (Amerine ve ark., 1972; Cabaroğlu ve ark., 1997). Üzümün bileşimi ise bağcılık yapılan bölgenin iklim koşulları, toprak yapısı ve coğrafyası gibi değiştirilemeyen faktörlerin ve üzüm çeşidi, anaç, bağcılık tekniği ve bağbozumu gibi değiştirilebilen faktörlerin etkisi altındadır (Amerine ve ark., 1972; Cabaroğlu, 1997).

Üzümde ihtiva eden başlıca maddeler şekerler, organik asitler, antosiyaninler, tanenler, aroma maddeleri, pektik maddeler, azotlu maddeler, vitaminler ve enzimlerdir (Cabaroğlu, 1997).

Şarabın tanımı ülkelerdeki mevzuatlarında tanımı benzer olmamaktadır. Ülkemizde halen yürürlükte olan Şarap Standardında şarap, “Taze üzüm şırası veya mayşesinin fermentasyonu ile elde edilen alkollü bir içkidir”, şeklinde tanımlanmaktadır. Alman Şarap Kanuna göre şarap; “üzüm şırasından elde edilen ve fermentasyon sonrasında en az 55 g/L alkol içeren bir içki” olarak tanımlanmaktadır. AB Şarap Kanununa göre şarap üretimi; genel anlamda taze şaraplık üzüm veya mayşesinin, üzüm şırasının, konsantre üzüm şırasının, kısmen fermente olmuş üzüm şırasının, üzüm suyunun, konsantre üzüm suyunun tamamen veya kısmen alkol fermentasyonuna uğratılmasıyla elde edilen ürünleri kapsamaktadır. Şaraplar üzümden elde edildiğinde şarap adıyla anılır. Ancak diğer meyvelerden üretilen şaraplar üretildikleri meyvenin adıyla (böğürtlen şarabı vb.) adlandırılır. Meyve şarabı üzüm dışındaki meyvelerden imal edilerek fermentasyona bırakılmasıdır Üzüm dışında şarap üretilir ise meyve şarabı olarak adlandırılır. Başlıca meyve şarapları; elma, armut, kavun, karadut, yaban mersini nar, böğürtlen ve vişne şaraplarıdır (Kalac, 2002).

Meyve şarabı üretimde dünyada en çok kullanılan meyve elmadır. Birçok yerde de bölgenin özelliğine göre çilek, ahududu, frenk üzümü, vişne, kiraz, portakal, erik, greyfurt gibi meyvelerle üretim gerçekleştirilir. Çok eski zamanlardan beri üretilmekte olan meyve şarapları batı ülkelerinde 6. yüzyıldan bu yana yapılmaktadır. Meyve şarapları üretimi Fransa, Almanya ve İngiltere başta olmak üzere, sonrasında da Avusturya, Rusya, Polonya ve İsviçre’de oldukça yaygındır. Almanya’nın yıllık meyve şarabı üretimi, yaklaşık olarak 15 milyon litre düzeyindedir. Meyve şarapları ülkemizde gelişmiş durumda değildir ve yeterince üretilmemektedir. Halbuki ülkemiz, çeşitli meyvelerin üretimini barındırmaktadır. Ülkemizde İzmir ve Nevşehir meyve şarabı üretilmektedir. Ülkemizde meyve şarapları üretimi son derece sınırlıdır. Piyasada meyve şarabı olarak satılan örneklerin ise gerçekte meyve şarabı olmayıp, farklı meyvelerle aromatize edilmiş üzüm şarapları olduğu görülmektedir. Bu durumun, kuşkusuz yasal olarak da değerlendirilmesi gerekir. Çünkü meyve şarabı sadece meyvelerden elde edilen şıranın alkol fermentasyonu ile elde edilen özel bir şaraptır (Anlı ve ark., 2006).

Yapılan araştırmalarda ABD’de meyve şaraplarına katılan su ve diğer katkı maddelerinin son ürün hacminin %35’inden fazla olmasına izin verilmediğini ancak böğürtlen, çilek, ahududu gibi üzümsü meyvelerden yapılan şaraplarda bu oranın % 60’a çıkabildiğini bildirmişlerdir. Meyve şarabı üretiminin yapıldığı birçok ülkede bileşimi ve üretimi hakkında yasal hükümler vardır ve üretimleri, üzüm şarabı üretiminden temelde

değişiklik gösterir. En büyük farklılık hammaddenin üzümünden farklı özellikte olmasıdır. Bunun dışındaki farklılıklar ise meyve suyunun sulandırılması, tatlılaştırılması, fermantasyon ve eskitme uygulamalarının kendine has olmasıdır. Meyve şaraplarının üretim aşamaları sırasıyla; meyveleri seçme, ayıklama, yıkama, parçalama, presleme, kükürt dioksit ilavesi, dinlendirme, tortudan ayırma, sakaroz ve maya ilavesi fermantasyon, süzme ve şişelemedir. Meyve şarapları üzerine ülkemizde günümüze kadar çok az sayıda da olsa çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002).

1.1.1. Meyve Şarapları Üzerine Yapılan Çalışmalar

Akman ve Yazıcıoğlu (1960), meyve şaraplarıyla ilgili bir değerlendirme yapmışlar ve aynı zamanda elma, armut, altıntop, portakal, erik ve kiraz şaraplarının üretim yöntemlerini açıklamışlardır. Ayrıca meyve sularının bileşimleri, meyvelerin işlenmesine genel bir bakış, meyve şıralarının ıslahı, meyve şarabı tipleri, fermantasyon, genç şaraplara uygulanacak işlemler, meyve şaraplarının dinlendirilmesi ve olgunlaştırılması, şişeleme, hata ve hastalıklar hakkında bilgi vermişlerdir. Araştırmacılar, meyve şarapçılığının üzüm şarapçılığından az çok farklı olduğunu; meyvelerin çoğunun bileşiminin tadı dengeli bir şarap üretimi için uygun olmadığını; meyvelerin çoğunda şeker az olduğundan potansiyel alkol miktarlarının düşük olduğunu ve mevcut alkol oranından daha fazla alkollü şarap elde etmek için meyve şırasına belirli bir miktarda şeker katmak gerektiğini; bazı meyvelerin şıralarında asitliğin çok yüksek olduğunu, bunu düşürmek için şıraya bir miktar su katıldığını, bazılarında ise asitliğin çok düşük olduğunu ve dengeli şarap üretmek için bu gibi meyvelerin şıralarına asit ilave etmek gerektiğini bildirmiştir.

Cemeroğlu (1982), çeşitli meyvelerin bileşimleriyle ilgili olarak yaptığı çalışma sonucunda kayısıda suda çözünmeyen kurumadde oranının %1,1 ile %2,5 arasında, suda çözünen kurumadde oranının %11 ile %15 arasında ve toplam asit oranının ise %0,6 ile %1,0 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Kim ve ark. (2003), meyve bileşiminin, olgunluk seviyesinin ve küf kontaminasyonunun çilek şarabının renk ve görünüşüne olan etkilerini araştırmışlardır. Kaliteli bir çilek şarabının premium roze şarabı rengine olduğunu, ancak çekici rengini kısa sürede kaybedip istenmeyen kahverengi bir tona dönüştüğünü bildirmiştir.

Anlı (2005), Vişne şarabı yapımı üzerine bir araştırma yapmışlar ve araştırmada Kütahya çeşidi vişne kullanmışlardır. Elde edilen şırada gerekli şeker-asit ayarlamasının

ardından Kalecik-1, Narince-3 mayalarıyla şaraplar yapmışlar ve Narince-3 mayasıyla daha iyi sonuç aldıklarını bildirmiştir. Meyvelerimizin alkollü içkiler endüstrisine önemli bir kaynak teşkil ettiğini vurgulamıştır. Şarap, likör ve rakı endüstrilerinin temel hammaddelerinin meyveler olduğunu, burada da hem iç hem de dış pazar bakımından büyük gelişmeler sağlanabileceğini, ihracat şartları düzenlendiği ve geniş ölçüde kaliteli üretime girildiği takdirde Türk şarapları, likör ve rakılarının dünya piyasalarında kolaylıkla satılabileceğini açıklamıştır. Bu üretim dalı için gereken hammaddeyi meyveciliğimizin bugün olduğu gibi gelecekte de sağlayabileceğini bildirmiştir. Ankara’da ekolojik koşullarında üretilen bazı elma çeşitlerinin şaraplık özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, natürel, asidi yükseltilmiş ve şeker katılmış şaralardan değişik katkı maddeleri de ilave ederek elma şarapları yapmışlar, elde ettikleri kimyasal ve duysal analiz sonuçlarına göre şeker ve asit katılan örneklerin daha olumlu sonuç verdiklerini bildirmiştir.

Ayanoğlu ve ark. (1993), Akdeniz Bölgesi ülkemizin en önemli meyvecilik bölgelerinden birisi olduğunu bildirmiştir. Çalışmada bölgenin kıyı kesiminde uzun yıllardır subtropik iklim meyvelerinin yaygın bir şekilde yetiştirilmekle birlikte sahilden yaylalara kadar uzanan alanlarda yer yer ılıman iklim meyvelerinin yetiştirildiği, özellikle Mut yöresinin yıllık yaklaşık 30.000 tonluk üretim ile sofralık kayısı ticaretinin merkezi durumuna geldiği bildirmiştir.

Meyve şaraplarını uzun süreli bekletilmesi sakıncalı olduğunu ve 6-12 ay arasında gerçekleşen bir sürenin dinlendirme için yeterli olduğunu bildirmiştir. Ayrıca araştırmacı uzun süreli dinlendirmenin meyve şaraplarının renginde ve aromasında olumsuz değişmelere neden olduğunu ve diğer şaraplarda izin verilmeyen şeker ve su ilavesinin meyve şaraplarında karakteristik meyvemsi aromayı korumak için gerekli olduğunu bildirmiştir (Gürbüz 2002).

Yapılan başka bir çalışmada Kuzey Avrupa Ülkelerinde iklimin üzüm yetiştiriciliğine uygun olmayışı nedeniyle meyve şarapları üretimi önem kazanmıştır, ancak Fransa gibi üzüm yetiştiricisi ülkelerde de meyve şarapları üretimi önemlidir. Avrupa ülkeleri arasında Fransa meyve üretiminin %30-40’ını şaraba işleyerek meyve şarapları üretiminde ilk sırayı almış, bunu açık bir farkla Almanya, İngiltere, Avusturya ve İsviçre’nin bildirmiştir. Başka bir çalışmada bazı meyvelerden çeşitli tipte şarap üretimi üzerine bir araştırma yapmış ve meyve şarapları üretiminde miktarca fazla olan meyvelere

öncelik verilmekteyse de, meyveye ait aromanın şarapta hissedilmesinin de önemli olduğunu bildirmiştir (Cemeroğlu, 1982)

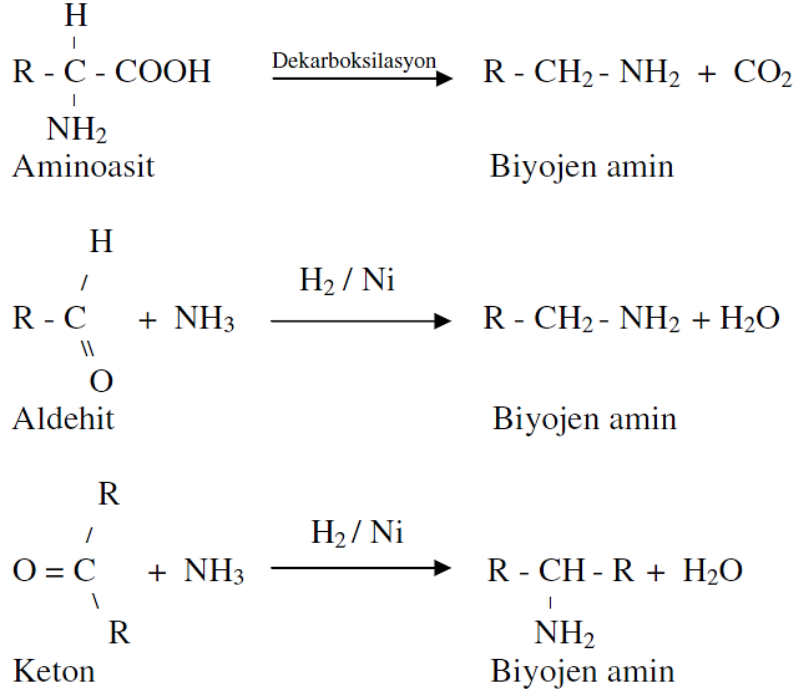
Araştırmacı çalışmada vişne, kayısı ve çileğin aromaca zengin meyveler olmaları, elmanın ülkemizdeki meyve üretiminde ikinci sırada yer alması, Stanley çeşidi eriğın ise yetiştirildiğı yörede pazarlama sorunları ile karşı karşıya bulunması nedeniyle materyal olarak seçildiğini bildirmiştir (Kim ve ark., 2003)

Yapılan çalışmada meyve türlerine göre toplam puanlar dikkate alarak bir karşılaştırma yapılmış ve kayısı şarapları hoş bukesi ve tadı ile ilk sırayı, vişne şarapları etkileyici rengi, karakteristik bukesi ve tadı, elma şarapları da kendine has ince bukesi ile ikinci sırayı almış, bunları erik ve çilek şarapları bildirmiştir (Cemeroğlu, 1982)

1.2. Biyojen Amin Oluşumu

Biyojenik aminler, çok sayıda fermente gıdada saptanan ve nicelenen düşük moleküler ağırlıklı organik azotlu bazlardır ve esas olarak bazı amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile oluşur. Bununla birlikte, aminler ayrıca belirli fermantif mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesi ile de üretilebilir (Stratton ve ark., 1991).

Biyojenik aminler kararlı bileşiklerdir ve bir kez oluştuktan sonra bunları ortadan kaldırmak zordur. Biyojenik aminlerin insanlar üzerinde hem faydalı hem de zararlı etkileri olduğundan, zararlı etkileri en aza indirmek ve uygun olanların yeterli bir şekilde alınmasını sağlamak önemlidir. Şekil 1.2’de aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu gösterilmiştir. (Galarce ve ark., 2016).

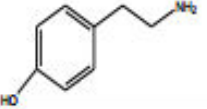
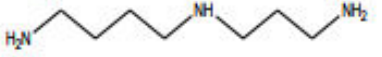
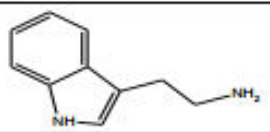
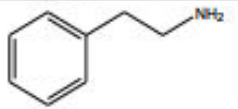
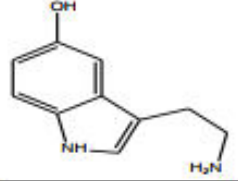
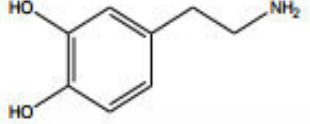
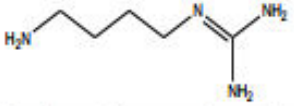


Şekil 1.2. Aminoasit dekarboksilasyonu, aldehit aminasyonu ve keton transaminasyonu (Galarce ve ark., 2016).

Histamin, tiramin, 2 feniletilamin, kadaverin, putresin, spermidin, spremin ve triptamin gıdalarda görülen önemli biyojen aminlerdir. Spermin, putresin, spermidin kadaverin, agmatin, gibi poliaminler gıdalarda kendiliğinden bulunurlar ve büyüme ve hücre çoğalmasına katılırlar (Kalac, 2002). Nitritlerin varlığındaki bu aminler, nitrozaminlere dönüştürüldüğünde potansiyel kanserojenler olabilir (Kim ve ark., 2003).

Poliaminlerden gelen nitrozaminler mutlaka toksikliğe ancak günlük bir öğünde beklenenden fazla miktarda tüketildikten sonra ulaşılmasından dolayı sağlık riski oluşturmayabilir (Kalac, 2002).

Gıdalarda oluşan biyojen aminlerden, histamin histidinin, putresin ortininin, kadaverin lizinin, triamin tirozinin, β -feniletilamin fenil alaninin, spermidin argininin ve triptamin de triptofan gibi amino asitlerin dekarboksilasyonları sonucu meydana gelmektedir ve biyojen aminler, oluşumlarının kaynağı olan amino asidin ismine bağlı olarak adlandırılırlar. Biyojen aminlerin kimyasal formülleri Şekil 1.3’de gösterilmiştir (Kalac, 2002).

Histamin (HIS)	
Tiramin (TYR)	
Kadaverin (CAD)	
Spermidin (SPD)	
Spermin (SPM)	
Triptamin (TRPT)	
Feniletilamin (PHEN)	
Serotonin (SER)	
Dopamin (DOP)	
Agmatin (AGM)	

Şekil 1.3. Biyojen aminlerin kimyasal formülleri (Kalac, 2002).

Genellikle amin üretimi aminoasitleri dekarboksile etme yeteneğine sahip bakterilerin varlığı sonucu gerçekleşmektedir (Shalaby, 1996).

Gıdalar protein veya serbest aminoasit içeriyorsa ayrıca mikrobiyal ve biyokimyasal aktiviteye imkan sağlanıyorsa biyojen amin oluşumu gözlenebilmektedir. Biyojen aminlerin oluşumu genelde gıda maddesinin içeriğine ve gıdanın barındırdığı mikroorganizmalara bağlıdır (Ten Brink ve ark., 1990).

Biyojen aminler kimyasal özelliklerine göre Tablo 1.1’de ve içerdikleri azot sayılarına göre Tablo 1.2’ de sınıflandırılmıştır (Halasz ve ark., 1994).

Tablo 1.1. Kimyasal yapılarına göre biyojen aminler (Halasz ve ark., 1994).

Aromatik ve heterosiklik	Alifatik	Alifatik uçucu
Histamin	Putresin	Etilamin
Triamin	Kadaverin	Metilamin
Triptamin	Agmatin	İzoamilamin
Seratonin	Spermin	Etanolamin

Tablo 1.2. İçerdikleri azot sayılarına göre biyojen aminler (Halasz ve ark., 1994).

Monoamin	Diamin	Poliamin
Etilamin	Putresin	Agmatin
Metilamin	Histamin	Spermin
Tiramin	Triptamin	Spermidin
Etanolamin	Kadaverin	

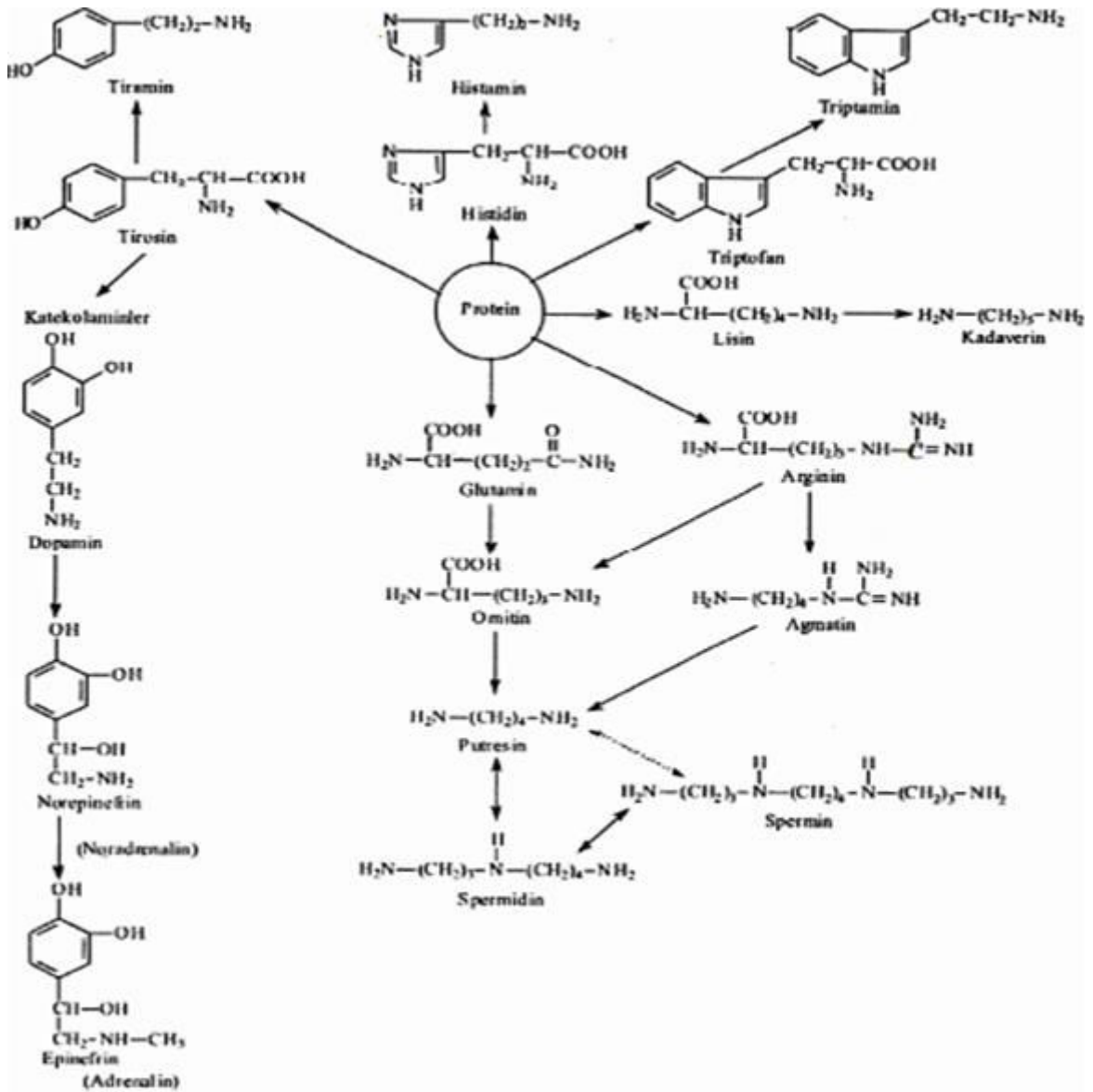
Bazı araştırmalarda, bakteri suşlarının biyojen amin ya da amin dekarboksilasyon enzimi ürettiği ortaya konmuştur (Maijala, 1993). Öte yandan amino asitler barsak florası bakterileri tarafından dekarboksile edilerek biyojen aminleri oluşturabilmektedir (Varlık, 1994). Çeşitli mikroorganizmalar örneğin; *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* gibi türleri amino asitleri dekarboksile ederek biyojen aminleri üretebilir (Suzzi ve ark., 2003).

Biyojen amin oluşumu sırasında ortamın pH'sı yükselerek mikroorganizma asidik ortamdan çıkar. Mayalarında bakteriler gibi biyojen amin üretebildiği görülmektedir. Histidin, lizin, ornitin, fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aminoasitler, *Brettanomyces claussenii*, *Cryptococcus laurentii* ve *Trichosporon beigelii* türü mayalar tarafından dekarboksile edildiği bildirilmiştir (Lehtonen, 1996).

Aminoasitlerden karbondioksit ayrılması sonucu biyojen amine oluşur. Organizmaya veya mikrobiyal yüke dayanarak da biyojen amin oluşumu gerçekleşmektedir. Aminoasitlerden karbondioksit grubunun kopmasına dekarboksilasyon denir. Bu olay dekarboksilaz enzimi sayesinde olur. Dekarboksilazlar genelde hayvansal ve

bitkisel dokular ile mikroorganizmalar sayesinde oluşabilirler. Genellikle dekarboksilazlar ya özel olarak tek bir aminoaside ya da farklı bir aminoaside etki ederler.

Bakteri türlerinin aminoasitleri dekarboksile etme yetenekleri benzer değildir. Bazı bakteriler birden fazla aminoasidi dekarboksile ettiği gibi bazıları da sadece bir tek aminoaside etki ederler (Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002). Şekil 1.4.'te biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu görülmektedir (Halasz ve ark., 1994).



Şekil 1.4. Biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu (Halasz ve ark., 1994).

Gıdalarda biyojen aminlerin oluşumu, pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, starter kültürler ve oksijenin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

1.2.1. pH

pH dekarboksilaz aktivesine tesir eden önemli olayların başında gelir (Silla-Santos, 1996). Ortam asitliğinin amin oluşumuna etkisi bağlamında gerçekleştirilen çalışmalarda, amin üretimi, bakterilerin asidik koşullara karşı korunma mekanizması olarak açıklanmaktadır (Halasz ve ark., 1994; Silla-Santos, 1996). Aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin asidik ortamda artış gösterdiği ve pH 4,0 ve 5,5 arasında optimum düzeyde olduğu bildirilmektedir (Silla Santos, 1996). pH 4,0'dan daha asidik pH değerlerinde söz konusu amin pozitif mikroorganizmaların yaşayamamalarından dolayı biyojen amin üretimi mümkün olmamaktadır.

Yapılan bir çalışmada aminoasit ekleyerek güçlendirilen MRS broth'da daha çok histamin, tiramin ve triptamin ürettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde ortamda glikoz gibi fermente olabilen şekerlerin varlığı bakterilerde hem büyümeyi hem de dekarboksilaz aktivitesini yükseltmektedir (Halasz ve ark., 1994). Böylelikle şekerin parçalanması ile laktik asit oluşur ve pH'da azalma meydana gelir ve biyojen aminler üretimi meydana gelir (Çolak ve Aksu, 2002).

Glikoz konsantrasyonlarının %0,5–2,0 değerleri arasında uygun olduğu, %3'den fazla olan oranlarda ise enzim oluşumunun inhibe edildiği gözlemlenmiştir (Halasz ve ark., 1994).

pH değeri yükseldikçe bakteriyel mikroflaraki kompleks de o oranda artmaktadır. Yani şaraptaki mikroorganizmalar için pH ayırt edici bir özelliğe sahiptir.

Şarapların pH değeri genellikle 3 ile 4 arasındadır ve pH 3 ve 4 aralığında amin üretimi fazla miktarda olmaktadır. Bunun başka bir örneğinin ise beyaz şarapların kırmızı kırmızı şaraplara göre daha asidik olması ve bu sayede beyaz şaraplarda ki biyojen amin miktarı kırmızı şaraplara göre daha düşüktür (Lonvaud-Funel, 2001).

Sucukların olgunlaşması sırasında pH'nın düşüşü ile birlikte bakteriler arasındaki rekabet sonucu, laktik asit bakterileri ortamda gelişerek baskın duruma geçmektedir. Bu durumda fermente sucuklarda amin pozitif laktik asit bakterileri baskın hale geçtiğinden biyojen amin üretimi gerçekleşmektedir. Hızlı ve ani pH düşüşü amin pozitif mikroorganizmaların, genellikle Enterobacteriaceae türlerinin gelişimini azaltmaktadır. Bu durum sucuklarda görülen yüksek oranda histamin üretiminin olgunlaşmanın ilk gününde görülen pH düşüşünün yetersizliğiyle ilgilidir. (Çolak ve Aksu, 2002).

1.2.2. Sıcaklık

Bakteriler biyojen amin üretirken sıcaklıktan faydalanmaktadır. Biyojen amin üremesi için optimum sıcaklık değerleri bakteriden bakteriye değişmektedir. (Çolak ve Aksu, 2002). *Enterobacter cloacae* bakterisi 24 saatlik bir inkübasyon sonrası 20 °C’de 2 mg/ml putresin üretirken 10 °C’de ise biyojen amin üretmediği gözlenmiştir. *Klebsiella pneumoniae* 20 °C’de 10 °C’ye göre daha fazla miktarda kadaverin üretimi gerçekleştirmektedir (Halasz ve ark., 1994).

Buzdolabında saklanan sucukalar oda sıcaklığında saklanan sucuklara oranla daha az oranla putresin oluşumu gözlenmiştir (Çolak ve Aksu, 2002).

Balık ve peynir endüstrisinde biyojen amin oluşumunun sıcaklık ile etkisi olduğu bilinmektedir (Suzzi ve Gardini, 2003). Gouda peynirleri üzerine yapılan bir çalışmada histamin miktarının artması sıcaklığın artması ile orantılı olduğu tespit edilmiştir (Stratton ve ark., 1991).

Klausen ve Lund (1986) tarafından yapılan bir araştırmada 10 °C’de depolan uskumru ve ringada biyojen amin miktarının 2 °C’ye göre 20 kat daha fazla biyojen amin içerdiği belirtilmiştir. Wendakoon ve ark. (1990) tarafından yapılan başka bir biyojen amin çalışmasında uskumrunun buzlukta depolandığı esnada hiçbir biyojen amin üretiminin gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

Yoshida ve Nakamura (1982) taze balıkta hiçbir histamin kalıntısına rastlamazken, oda sıcaklığında bekletilen balıklarda histamin oranının 24 saat içinde 28,4 ppm’e ve 48 saatten sonra 1540 ppm’e ulaştığını belirtmişlerdir. Balıkların düşük sıcaklıkta depolamasında biyojen amin üretmesini engellemekte olduğunu belirtmişlerdir (Shalaby, 1996).

1.2.3. Tuz

Tuz ve tuzlu bir ortamın, biyojen aminlerin üremesi üzerinde etkisi vardır. % 5’ten az tuz konsantrasyonun da histamin üretmesinin arttığı bilinmektedir (Çolak ve Aksu, 2002). Tuzlama, histidin dekarboksilaz aktivitesini inhibe etmektedir. Ancak bakteri tuza dayanaklı ise bu durum söz konusu değildir. Örneğin % 12 oranında NaCl’ye sahip sardalye etinde biyojen amin gözlemlendiği bildirilmiştir (Shalaby, 1996). *Carnobacterium*

divergens'in tiramin üretiminin araştırıldığı bir çalışmada % 10 NaCl'un tiramin oluşumunu engellendiği belirtilmiştir (Masson ve ark., 1997).

Fermente sucukların depolanması ve fermentasyonu sırasında su miktarındaki ve tuz/su oranındaki değişiklik mikroorganizmaların çoğalması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Suzzi ve Gardini, 2003).

Yapılan bir çalışmada; ortamın tuz konsantrasyonunun 0'dan % 6'ya çıkarılmasıyla *Lactobacillus bulgaricus*'un ürettiği amin miktarının büyük ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Bu negatif etki, yüksek NaCl konsantrasyonu nedeniyle, hücre bölünmesinin azalması ve/veya mikrobiyal dekarboksilaz enzimi taşıyan membranlarda meydana gelen hasar olmak üzere iki nedene bağlanabilmektedir (Gardini ve ark., 2016)

Suzzi ve Gardini, (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *Enterococcus faecalis* EF37 suşunun M17 broth ve çiğ sütteki aktivitesi; inkübasyon sıcaklığı, NaCl konsantrasyonu ve ortam pH'sı olmak üzere üç farklı değişkene göre belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada ortam sıcaklığının etkisinin olmadığı ancak yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük pH'da biyojen amin üretiminin azaldığı belirlenmiştir.

Sıcaklık faktörünün biyojen amin üretimi üzerinde artışa sebep olması gerekirken bu çalışmada biyojen amin üretimi üzerinde etkisiz görünmesinin sebebi 72 saat gibi kısa bir inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiş olmasına bağlanmıştır.

1.2.4. Starter Kültürler

Fermente gıdaların üretilme aşamasında pek çok farklı mikroorganizmanın varlığı bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin varlığı putresin, kadaverin, histamin ve tiramin üretimini sağlamaktadır (Ten Brink ve ark., 1990; Silla-Santos, 1996).

Biyojen amin üretimin azaltılması için starter kültür kullanımı ile iyi bir çözüm yolu teşkil ettiği belirtilmektedir. Starter olarak kullanılan mikroorganizmalar, *Enterobacteriaceae* gibi biyojen amin oluşumuna neden olabilecek mikroorganizmaların gelişimini azaltıcı etkiye sahiptirler. Sucuk üretimi sırasında starter kültür kullanımı, biyojen amin üretmesinin azalttığını fakat önlemediği belirtilmiştir (Hernandez-Javer ve ark., 1997).

1.2.5. Oksijen

Aminlerin biyosentezinde oksijenin etkisinin de önemli olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (Halász, 1994). *Enterobacter cloacae*, anaerobik koşullarda aerobik koşullara kıyasla yaklaşık yarısı kadar putresin üretmekte iken, *Klebsiella pneumoniae* 'nın ise aerobik koşullarda daha fazla putresin ve kadaverin ürettiği belirlenmiştir (Shalaby, 1996).

1.3. Gıdalarda Bulunan Biyojen Aminler

Biyojenik aminler, enzimatik bozunma veya fermentasyon işlemlerinin bir sonucu olarak şarap, bira, balık ve et gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunur (Vidal ve ark., 1983). Konsantrasyon seviyeleri yüksek olduğunda doğrudan veya dolaylı toksisiteye neden olabilirler. Bu nedenle, bazı ülkeler çeşitli yiyecek türlerinde alım içerikleri için düzenlemeler koymuşlardır. Canlıların bünyesinde biyojen aminlerin rolü önemlidir. Gıdalarda yüksek oranlarda vücuda alınması zehirlenmelere yol açabilmektedirler. Genellikle balık ve ürünleri, et ve ürünleri, süt ürünleri, fermente içki ve sebzeler, meyve ve sebzeler, gibi önemli ürünlerde biyojen bulunmaktadır (Silla-Santos, 1996).

Biyojen aminler gıdada doğal olarak ve işleme veya depolama sonucunda bulunur. İnsan ve hayvan hayatını tehlikeye sokabilen toksik biyojen aminler vücudumuzda sentezlenmekte olup ayrıca gıdalar ile de alınmaktadır. Doğal olarak meyve ve sebzelerde bulunurlar. Proteince zengin ve fermente edilmiş gıdaların bozulması sonucu da biyojen amin oluşabilir. Gıdalardaki biyojenik amin içeriğini belirlemek için farklı tekniklere dayalı birçok analitik yöntem açıklanmıştır. Biyojen aminleri tespit etmede kullanılan HPLC tercih edilen yöntemdir (Isabel ve ark., 2006).

Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı mikrobiyal kontaminasyonun da bir göstergesidir. Bu nedenlerden gıdalarda biyojen aminlerin belirlenmesi önemlidir. Ancak özellikle patolojik durumlarda (tümör oluşumu) poliamin alımı minimize edilmelidir (Bardocz, 1995).

Gıdalarda ve içeceklerde biyojen aminler esas olarak amino asitlerden fermentasyon işlemlerinden sorumlu olan ve gıda kontaminasyonu veya bozulmasına bağlı olabilen mikroorganizmaların substrata özgü dekarboksilaz aktivitesi yoluyla üretilir. Bu

nedenle, biyojen aminlerin kalitatif ve kantitatif varlığı hem gıda kalitesi hem de kötü üretim uygulamalarının bir endeksi olarak önerilmiş ve önerilmiştir (Halasz ve ark., 1994).

Biyojen aminler, bitki, hayvan ve mikroorganizmaların çeşitli metabolik aktiviteleri sonucu üretilen, alifatik, aromatik ve özellikle de heterosiklik yapılar içeren ve gıdalarda da bulunabilen küçük moleküllü toksik bileşikler olarak adlandırılmaktadır. Biyojen aminler, bazı gıdalarda (meyve, sebze ve balıklarda) doğal olarak görülürken; bira, şarap ve peynir gibi gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucundaki fermentasyon vasıtasıyla üretilirler. Et ve balık gibi son derece bozulabilen gıdalarda, üretim ile kullanım sırasında kullanılan kalite ve hijyen prosedürleri arasında bir korelasyonu ifade edebilen bir biyojenik amin endeksi oluşturmak mümkündür (Ten Brink ve ark., 1990).

Fermente gıdalarda biyojen aminler için belirlenen toksik limitler 50-100 mg/kg histamin, 100-800 mg/kg tiramin, 30 mg/kg feniletilamin, 396 mg/kg putresindir.

Gıdalarda biyojen aminin bulunması gıda bozulmasının ve gıdanın güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Yüksek düzeyde biyojen amin içeren ve vücuda alındığı zaman baş ağrısı ve dönmesi, solunum zorluğu, kalp çarpıntısı, mide bulantısı ve kanama gibi hastalıklar görülür ve daha ağır durumlarda ölüme bile yol açabilmektedir (Gardini ve ark., 2016).

Biyojen aminlerin gıdalarda tespit edilmesi üretim ile depolama şartlarına ve uygulanan işlemlere göre farklılık göstermektedir. Biyojen amin gelişimini önlemek için dekarboksilaz aktivitesini durdurmak ve bakteriyel gelişimin engellenmesinde büyük rol oynamaktadır.

1.3.1. Et ve Et Ürünleri

Yeni kesilmiş hayvan etlerinde genellikle yüksek oranlarda sprem ve spermidin bulunmaktadır. Ayrıca et bozulmalarından tiramin, kadaverin, putresin ve histamin gibi biyojen aminler sorumludur. Bu biyojen aminlerin bazı pişirilmiş et ürünlerinde yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiş ve bu durum hijyenik kalitesi açısından kötü etlerin kullanılmasının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir (Hernandez ve ark., 1996).

Fermente et ürünlerinde biyojen amin birikimi mikrobiyal floranın nicel ve nitel kompozisyonu, fizikokimyasal farklılıklar ve üretim sırasında uygulanan hijyenik koşullar gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Tablo 1.3'te farklı etlerde bulunan biyojen amin miktarları gösterilmektedir (Stratton ve ark., 1991).

Tablo 1.3. Et ürünlerindeki biyojen aminler (mg/L) (Stratton ve ark., 1991)

Et Ürünleri	Putresin	Histamin	Kadaverin	Spermin	Tiramin
Sığır Eti	2,3	2,3	8,4	25,8	23,5
Tavuk Eti	5,9	0,8	8,6	58,2	22,8
Salam	186	10,4	151	19,6	226
Jambon	229	124	47,3	326	254
Sucuk	115	10,6	24	59,3	192

Et ve et ürünlerinde *Escherichia coli*, *Pseudomonas* ve *Klebsiella oxytoca* gibi amin üreten koliform bakteriler ile *Lactobacillus carnis* gibi laktik asit bakterileri biyojen amin üretiminden sorumlu bakterilerdir. Fermente sucuklar üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada; izole edilen *E.faecalis* suşlarının tümünün tiramin üretme yeteneğinde olduğunu bilinmektedir (Maijala, 1993).

Fermente sucuklardaki histamin oluşumunun olgunlaşmanın 14. Gününden itibaren gerçekleştiği ve oluşumunun ortamdaki laktik asit bakterileriyle ilgili olduğu belirtilmiştir. Ülkemizde üretilen sucuklarda olgunlaşma süresince tiramin oranının, olgunlaşmanın 3. gününde artış gösterdiğini ve 6. gününde ise maksimum seviyeye ulaştığını ve daha sonraki günlerde ise tiramin oranında düşüş gözlenmiştir (Yalçın ve ark., 1995).

Sosislerden izole edilen *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan mikroorganizmalar genelde yüksek dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar olarak görülmektedir. Özellikle putresin ve kadaverin üretiminde rol oynamaktadırlar. Mikrobik kontaminasyon, düşük kaliteli hammadde kullanımı ve uygunsuz depolama et ve et ürünlerinde biyojen amin varlığının önemli sebeplerindendir. Sosisler genellikle önemli miktarda histamin barındırabilmektedirler. Sosislerin olgunlaşmaya bırakıldığı zaman ve hatta olgunlaşmanın ilk üç gününde histamin miktarında artış gözlenmiştir. Oluşan histamin miktarı fermente sosislerde olgunlaşma süresine ve fermentasyon koşullarına bağlıdır. Biyojen aminler kuru fermente sosislerde de önemli miktarda bulundurmaktadır. Üretimde kullanılan hammadde, laktik asit bakteriler, ürünün pH'sı, su aktivitesi, redoks potansiyeli, NaCl biyojen amin oluşumunda oldukça önemli faktörlerdir. Hammaddelerin mikrobik kalitesi kuru sosiste amin oluşumunu etkileyen bir faktör gibi görünmektedir. Sosis imalatı sırasındaki fermentasyon işlemi, hem mikroorganizmalar hem de amin

oluşumu ve çevresel koşullar (pH ve sıcaklık) için gerekli olan bakteriyel büyümeyi ve dekarboksilaz aktivitesini destekleyen serbest amino asitleri sağlar (Stratton ve ark., 1991).

Kuru kürlenmiş sosislerin olgunlaşması sırasında tehlikeli seviyelerde biyojenik amin oluşur ve bu oluşumu önlemek için, kritik faktörler bilinmelidir (Isabel ve ark., 2006). Laktik asit bakterileri özellikle kuru kürlenmiş sosislerde histamin ve tiramin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Finlandiya’da üretilen kuru fermente sosislerde bulunan en çok bulunan biyojen aminler tiramin ve putresindir. Danimarka’da üretilen sosislerde kadaverin yüksek miktarlarda bulunmuştur. Rusya’da üretilen kuru fermente sosislerde histamin 100 mg/kg’ın altında tespit edilmiştir. Türkiye’de üretilen sucuklarda triptamin örneklerin çoğunda tespit edilmiştir. 350 mg/kg ile 1100 mg/kg aralığında tiramin ve histamin bulunmuştur. Bazı örneklerde ise putresin ve tiramin tespit edilmiştir. Fransız sosislerinde putresin, kadaverin, tiramin ve histamin tespit edilmiştir. İtalya’da üretilen sosislerde tiramin en fazla bulunan biyojen amindir (Özoğul ve ark., 2004).

1.3.2. Balık ve Ürünleri

Balık ve ürünleri yüksek miktarda protein içerirler. Biyojen aminler taze balıkta çok az oranda görülmemekte yada görülmemektedir. Balık hasat ile tüketim arasındaki süreçte uygun koşullarda işlenip depolanmaz ise insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabilir. Balıkta biyojen amin oluşumu serbest amino asit miktarı ile ilişkilendirilmektedir. Balığın bozulması sırasında oluşan proteoliz ile serbest amino asitler oluşmaktadır. Aynı zamanda, ortamda bulunan ve dekarboksilaz enzimi üretebilen mikroorganizmalar yardımıyla serbest amino asitler biyojen aminlere dönüştürülmektedirler. Bu nedenle balık ürünlerinde, biyojen aminlerin varlığı yüksek miktarda bulunmaktadır (Özoğul ve ark., 2004).

Balıkta en çok histamin, kadaverin ve putresin gibi biyojen aminlere rastlanılmaktadır. Taze balık ve konserve balık üretiminde histamine rastlanabilmektedir. Konserve yapımında hammadde olarak kullanılan hijyensiz balıklar, kötü depolama ve uygun olmayan işlenme konservelede histamin oluşmasına neden olabilir (Laurent, 1995).

Balık ve balık ürünlerindeki biyojenik amin formasyonu direk olarak balıktaki serbest aminoasit düzeyi ile ilişkili olmaktadır. Balık ve Balık ürünlerinin kalitesini belirleyen en önemli indikatörler putresin, kadaverin, spermidin ve histamindir. Yapılan bir çalışmada, histamin oluşumunun en yüksek 35-40 °C sıcaklıkta, pH 5,5-6,5 arasındaki

değerlerde ve %2-4 tuz oranında görülmüştür. pH 8’de ise hiç histamin gözlenmemiştir. Histamin oluşumunun tuz konsantrasyonunun sıfır olduğu durumlarda maksimum seviyeye ulaştığı ve tuz konsantrasyonu arttıkça histamin oluşumunun azaldığı belirlenmiştir (Hwang ve ark., 1995).

Pseudomonas phosphorum bakterisinin en uygun 25 °C’de geliştiği ve 35 °C’nin üzerine çıkıldıkça gelişmenin durduğu belirlenmiştir. Bu bakterinin optimum gelişme pH’sı ise 5.5-8.0 olarak belirlenmiştir. Taze ve konserve tuna balıkları hakkında yapılan bir çalışmada da, 10 adet biyojen amin incelenmiş ve bu gıdaların sterilizasyonu sonrasında yalnızca spermin ve spermidin miktarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Pomatomidae*, *Coryhaemidae*, *Corangidae*, *Clupeidae* ve *Engraulidae* familyalarında ki balıklar histamin zehirlenmelerinde en etkili balıklardır. Bazı kılıçbalığı türleri de özellikle black marlin ve striped marlin Japonya ve A.B.D.’de scombroid zehirlenmelerine neden olmuştur. Tayvan’da tuna, uskumru ve kılıçbalığı scombroid zehirlenmelerine yol açmıştır (Hwang ve ark., 1995).

1.3.3. Peynir

Peynirde biyojenik aminlerin üretimi genellikle başlangıçta olmayan laktik asit bakterileri ve *Enterobacteriaceae* üyeleri ile bağlantılıdır (Joosten, 1987). Peynir, diğer fermente gıdalar gibi, genellikle mikroorganizmaların amino asit dekarboksilaz aktivitesinden kaynaklanan yüksek konsantrasyonda biyojenik aminler içerir (Leitao ve ark., 2005)

Peynir yüksek amin içeriğine sahip olan gıdalardan biridir. Peynir üretimi, biyojen aminlerin gelişmesi için uygun bir ortamdır. Peynir üretimi aşamasındaki ortamda serbest amino asitlerin bulunması ve üretim sırasında ilave edilen mikroorganizmalar veya kontamine olan mikroorganizmalar biyojen amin oluşumuna yol açmaktadır. Mikrobiyal gelişim ve dekarboksilaz aktivitesi için gerekli koşulların (pH, tuz konsantrasyonu, sıcaklık, su aktivitesi, olgunlaştırma sıcaklığı ve zamanı, depolama sıcaklığı, uygun kofaktörlerin ortamda bulunması) sağlanması da biyojen amin oluşmasına etki etmektedir (Halasz ve ark., 1994).

Birçok koliform bakteri, sırasıyla ornitin ve lizin dekarboksilasyonu ile putresin ve kadaverin oluşturabilir (Petridis 1996).

Ancak normal şartlar altında bu bakteriler yavaş büyür ve hızla ölür. Bu nedenle, peynirde yüksek konsantrasyonlarda aminlerin varlığı, ortamda laktik asit bakterilerinin bulunmasına bağlı olduğu belirtilmiştir. Peynirler içerdiği biyojen amin miktarı nedeniyle önemli gıdalar arasında yer almakta ve peynirlerde oluşan en önemli biyojen aminlerin; tiramin, histamin, putresin, kadaverin, triptamin ve β -feniletilamin olduğu belirtilmiştir. Bu amin miktarlarının, olgunlaşma süresiyle pozitif bir ilişki içinde olduğu bildirilmiştir (Shalaby, 1996; Ordenez ve ark., 1997).

Peynir yapma aşamasında histidin, dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğundan histidini histamine dönüştürebilmektedir. Peynirleri toksikolojik açıdan korumak ve bozunma reaksiyonlarını önlemek için düşük konsantrasyonlarda amin içeren peynirler üretmek yararlıdır. Bununla birlikte, peynirlerde serbest amino asitlerin ve biyojenik aminlerin bulunması, karakteristik doku ve aroma elde etmek için de önemlidir (Joosten ve ark., 1996).

Biyojenik aminleri ve öncülerini belirlemek için birçok peynir inceleme çalışması yapılmıştır. Birçok peynir tipinde tiramin, histamin, putresin, kadaverin, triptamin ve B-feniletilamin gibi çeşitli aminler tespit edilmiştir. Farklı peynir çeşitleri arasında histamin ve tiramin konsantrasyonları büyük ölçüde değişiklik gösterir (Stratton ve ark., 1991).

Peynir üretimindeki proteoliz esnasında histamin oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Peynirin rengi, lezzeti ve yapısındaki bazı değişiklikler proteoliz aşamasında meydana gelmektedir ve bu aşamada amino asit içerikleri yüksek oranda artmaktadır. Proteoliz zamanı arttıkça biyojen arttığı gözlenmiştir. Bu yüzden aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu ile biyojen aminler meydana gelmektedir (Stratton ve ark., 1991). Ayrıca olgunlaştırma süresi arttıkça serbest aminoasit içeriğinin artmasından ötürü biyojen amin oluşma olasılığı da artmaktadır (Ordenez ve ark., 1997).

Yüksek sıcaklıkta bekletilen peynirlerde mikroorganizma sayısı artar ve biyojen amin miktarı da buna paralel olarak artış gösterir. Bu nedenle peynirlerin düşük sıcaklıkta depolanması ve olgunlaştırılması sırasında biyojen amin gelişimi kontrol altına alınabilir (Joosten, 1996).

Petridis (1996) tarafından Azeitao peynirlerinde yapılan bir çalışmada 4°C'de depolanan peynirlerdeki biyojen amin miktarının, oda sıcaklığında depolanan peynirlere oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Oda sıcaklığında depolama sonucu tiramin ve putresin miktarında meydana gelen artıştan yola çıkarak söz konusu iki aminin olgunlaştırılmış peynirlerde sıcaklık değişikliğinin indikatörü oldukları ifade edilmiştir.

Lactobacillus buchneri bakterisi, peynirlerde görülen histamin zehirlenmelerinin başında gelir (Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002). Bununla birlikte *L. Fermentum*, *L. Helveticus*, *L. Tactis*, *Enterococcus faecium* gibi çeşitli bakterilerin de peynirlerde histamin oranını arttırdığı belirtilmiştir. Çiğ sütte bulunan histamin üreten bakterilerin gelişimini durdurmak ya da sınırlamak peynir üretimindeki histamin artışını engelleyebilmektedir. Histamin üretme yeteneğine sahip olan *L. bunchneri*, Gouda peynirlerinde pek çok farklı koşullar altında yapılan denemeler sonucunda karakterize edilmiştir (Stratton ve ark., 1991).

Peynirlerin *L. bunchneri* ile kontaminasyonu sonucu histamin ve tiramin oluşumu artmaktadır. Bununla birlikte bu oluşum, hipertansiyon krizine ve şiddetli baş ağrısı da eşlik etmektedir (Ekici ve ark., 2002).

Yapılan bir çalışmada, depoda, olgunlaşmış peynirlerde yıkanmış ve yıkanmamış peynir arasında araştırma yapılmış. Yıkanmamış kabuklu peynirlerde putresin, kadeverin ve tiramin aminleri gözlenmiş olup 100mg/kg seviyesine ulaştığı belirtilmiştir. Bulunan diğer biyojen aminlerin seviyelerinin ise düşük çıktığı gözlemlenmiştir. Yıkanmış olan kabuklu peynirler incelendiğinde triptamin, feniletilamin ve histamin gibi biyojen aminler tespit edilmemiştir. Bununla birlikte üretimin hijyenik koşullarda yapılması mikrobiyal kirliliği azaltmaktadır. Değişik peynir türlerinde görülen biyojen aminler Tablo 1.4'te gösterilmektedir (Gloria ve ark., 1998).

Tablo 1.4. Farklı peynirlerdeki biyojen aminler (Gloria ve ark., 1998).

Peynir Çeşitleri	Biyojen Aminler
Beyaz peynir	Kadaverin, putresin, tiramin
Tulum peyniri	Feninetilamin, putresin
Camembert	Kadaverin, putresin, tiramin
Cheddar	Kadaverin, putresin, tiramin, 2-feniletilamin
Gouda	Kadaverin, putresin, triptamin, tiramin
Gruyere	Putresin
Mozzarella	Kadaverin
Roquefort	Kadaverin, putresin, tiramin

Brezilya’da üretilen peynirlerde, yapılan araştırmalarda, peynirlerin hepsinde spermin bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 111 mg/100 g kadaverin, 21,25 mg/100 g tiramin, 19,65 mg/100 g histamin ve 17,37 mg/100 g putresin bulunmuştur. Tespit edilen diğer biyojen aminlerin miktarı ise 4.1 mg/100g’dan daha küçük olduğu belirtilmiştir.

1.3.4. Meyve ve Sebzeler

Turunçgiller, muz, çilek, üzüm ve karpuz gibi meyveler farklı oranlarda biyojen amin içermektedirler. Aminler bitkilerin kendi yapısında bulundukları için meyve ve sebzelerde geniş bir dağılım göstermektedir. Meyve ve sebzelerin amin içerikleri olgunluk dereceleri göre değişiklik göstermektedir. Meyve ve meyve sularının özellikle putresin içeriği yüksektir (Shalaby, 1996). Yeşil sebzeler spermidin bakımından zengindir. Isıl işlem sonrası sebzelerin biyojen amin içeriğini etkileyebilmektedir (Cirilo ve ark., 2003; Shalaby, 1996).

Meyve ve sebzelerde bulunan serbest biyojen aminler gıdaların tipik ve karakteristik olgunluk tadının şekillenmesinde rol oynamaktadırlar. Ayrıca serbest biyojen aminler belirli aroma maddelerinin öncü maddeleridir. Diğer taraftan biyojen aminlerin sebzelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunması uzun depolanma süresinin sonucu ortaya çıkan bozulmayla ilgilidir. İşlem görmüş sebzelerde depolama ve olgunlaşma şartlarına bağlı olarak biyojen aminlere rastlanılmaktadır (Moret ve ark., 2010).

Kalac ve ark. (2002) tarafından dondurulmuş sebzelerde biyojen amin analizleri gerçekleştirilmiştir. Birçok örnekte putresin ve spermidinin bulunduğu gözlenmiştir.

Sebzeler üzerinde yapılan mikrobiyal çalışmalarda, bakterilerin sebzelerde baskın mikroorganizma grubunun olduğunu gözlenmiştir. Küf ve mayaların düşük oranda bulunduğu da ifade edilmiştir. Meyvelerin pH değerleri sebzelere oranla düşük olduğundan asit-tolere edebilen fungi ve laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmaların gelişimi dahi sınırlandırılabilir. Bitkisel kaynaklı gıdalarda arginin vardır, arginin dekarboksilasyonu sonucu agmatin, agmatinden de putresin oluşur. Bitkilerde potasyum ve magnezyum eksikliğinde ve yüksek amonyum konsantrasyonlarında agmatin birikimi fazla olmaktadır (Halasz ve ark., 1994).

Yapılan başka bir çalışmada dondurulmuş ıspanak püresi, ketçap, konsantre salça ve yeşil bezelyede bulunan biyojen amin düzeyleri elektrokinetik kapiler kromatografi tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada putresin ve spermidin tüm örneklerde tespit edilebilir düzeyde bulunurken, histamin, spermin ve kadaverin konsantrasyonları tespit edilebilir limitlerin altında bulunmuştur. Çin lahanası ve bazı marul türlerinde gramda 14 ile 20 mikrogram arasındaki konsantrasyonlarda değişen amin tespit edilmiş olup, spermidinin bu sebzelerdeki başlıca poliamin olduğu ifade edilmiştir (Kalac ve ark., 2002).

Turunçgiller, üzüm, ahududu ve çilekten elde edilen meyve sularında değişik oranlarda biyojen amin bulunmaktadır. Bu meyve sularında putresin içeriği tespit edilmiştir. Kakao kullanılarak yapılan çikolata ve ürünlerinde ve şekerlemelerde b-feniletilamin barındırabilmektedir. (Silla Santos, 1996).

Batı Afrika yerlileri tarafından tüketilen bir muz çeşidinde büyük miktarlarda serotonin içerdiği bilinmektedir. Bu muz çeşidini çok tüketen Afrika yerlileri arasında sık görülen bir hastalık görülmüştür. Bu hastalığın vücuda devamlı şekilde alınan serotonininden kaynaklandığı düşünülmektedir. Muz dünyada en çok tüketilen meyveler arasındadır. Muz örneklerinde biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, örneklerde biyojen aminlerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu olgunlaşmamış meyveler, olgunlaşmış meyvelere oranla daha az biyojen amin içerdiği bilinmektedir (Tassoni ve ark., 2004).

1.3.5. Şarap

Şaraplarda biyogenik aminlerin varlığına ilk referans 1954'te Tarantola tarafından yapılmıştır (Tarantola, 1954). O zamandan bu yana birçok araştırmacı ve uluslararası şarap organizasyonu için biyogen aminler önemli bir endişe haline gelmiştir (Busto ve ark., 1996).

Alkollü içeceklerde, aminler ve etanol arasında görünen sinerjik etkiyi dikkate almak önemlidir. Biyogen aminlerin konsantrasyon seviyeleri yüksek olduğunda doğrudan veya dolaylı toksisiteye neden olabilirler. Şarapta biyogenik aminler kokusuz tuzlar halinde ortaya çıkar, ancak ağızda aminler kısmen serbest kalır ve aromaları belirginleşerek şarabın duyusal özelliklerini etkiler (Lehtonen, 1996).

Şaraplarda biyogen aminlerin belirlenmesi, yapıları nedeniyle karmaşık bir matriste bulunduğu için genellikle düşük seviyelerde bulunurlar ve biyogen amin tespiti basit değildir. Farklı analitik teknikler arasında HPLC, yüksek çözünürlüğü, hassasiyeti, çok yönlülüğü ve basit olması nedeniyle genellikle en yaygın şekilde kullanılır (Anlı ve ark., 2004)

Şaraplardaki biyogen aminlerin kaynağı şıra, alkol fermentasyonu sırasındaki mayalar ve malolaktik fermentasyonu sağlayan bakterilerdir. *Klebsiella* ve *Proteus* gibi enterik bakteriler de bulaşma yoluyla şaraplarda biyogen amin oluşumuna sebep olabilmektedir. Hijyenik şartlarda yapılan şaraplarda biyogen amin varlığı düşük seyrederek ya da hiç bulunmaz (Vidal ve ark., 1983).

Biyogenik aminlerin miktarları ve bileşimi, üzümün türüne ve olgunluğuna, bağcılık alanının iklimi ve toprak tipine ve vinifikasyon tekniklerine bağlıdır. Genellikle şaraplarda bulunan biyogenik aminler agmatin, spermin, spermidin, putresin, kadaverin, histamin ve tiramindir (Soufleros ve ark., 1998).

Yapılan bir çalışmada, sulama derecesinin üzümdeki endojen amin içeriğini ve şarap yapım sürecinde evrimini etkileyip etkilemediğini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, su stresinin şaraplarda biyogen amin seviyesini etkileyen bir faktör olmadığı sonucuna varmışlardır (Bover-Cid ve ark., 2006).

Şarap yapımı sürecinde hijyen eskikliği biyogen amin oluşumunu etkilemektedir. Genellikle kırmızı şarap ile beyaz şarap yapma arasında proseslerin farklı olması sebebiyle

kırmızı şaraplar beyaz şaraplardan daha çok biyojen amin barındırırlar. Şaraplar depolanırken maya tortusu ile bekletildiğinde, ortamda laktik asit bakterileri, hidrolize ve dekarboksile etmek için daha fazla peptid ve serbest amino asit bulabilmektedir. Bu yüzden tortuya dokunan şaraplarda fazla miktarda biyojen amin oluşmaktadır. Şıranın bileşimini, üzümün cinsi, asmanın yetiştirilme koşulları ve maya metabolizması etkilemektedir (Martín ve ark., 2006).

Ortamdaki yüksek amino asit konsantrasyonu, şarap yaşlanması sırasında daha fazla biyojen amin üretebilir, çünkü amino asitlerin dekarboksilasyonu asit ortamına karşı mikroorganizma savunma mekanizmalarının bir parçasını oluşturur (Lonvaud-Funel, 2001).

Yapılan bir çalışmada üretim yılı 2001 ve 2002 olan şaraplar üzerinde incelenmiştir. 2001'de üretilen şarapların 2002'de üretilen şaraplardan önemli ölçüde daha yüksek biyojen amin değerlerine sahip olduğunu belirtmişlerdir Bunun nedenini ise bekletilen şaraplarda aminoasit değerinin artmasına bağlamışlardır (Martín ve ark., 2006). Öte yandan diğer araştırmacılar şarapta alkolik fermantasyon sırasındaki biyojen amin oluşumu ile amino asit içeriği arasında hiçbir ilişki bulamamışlardır (Torrea, 2001)

Portekiz'de yapılan bir çalışmada biyojen aminler tespit edilmiştir. Biyojenik aminlerin konsantrasyonları kırmızı şaraplarda, beyaz şaraplardan daha yüksek çıkmış ve bu fark vinifikasyon tekniklerindeki farklılıklar ile açıklanmıştır. Bazı beyaz şaraplarda alkol fermentasyonundan sonra meydana gelen malolaktik fermentasyon şaraplarda gereklidir. Dekarboksilasyon ile malik asidin uzaklaştırılması ve duyu kalitenin geliştirilmesi bunun asıl sebebidir. Ancak şaraplarda meydana gelen malolaktik fermantasyon ile şarapların biyojen amin düzeylerindeki artış arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Isabel ve ark., 2006).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Farklı meyve türlerinden elde edilen (vişne, yaban mersini, nar, böğürtlen, çilek, karadut ve kavun) değişik marka ve yıllarına ait 10 meyve şarabı örneği piyasadan tüketime hazır olarak temin edilmiştir.

2.2. Metot

Kullanılan standart biyogen aminler; putresin dihidroklorür, kadaverin dihidroklorür, feniletilamin hidroklorür, tiramin hidroklorür, histamin dihidroklorür, triptamin dihidroklorür.

2.2.1. Borat tamponu

2,47 g borik asit yeterli, miktardaki distile suda çözülecek, 1,0 M NaOH ile pH'ı 9 a ayarlanarak ve 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.2.2. O-fitaldialdehit

50 mg o-fitaldialdehit 2,25 mL metanolde çözdürülmüştür. Üzerine 50 µL 2-merkaptetanol eklenmiş ve 0,25 mL 0,4 M borat tamponu ile çözündürülmüştür.

2.2.3. Asetat Tamponu

3,4 g (5 mmol) sodyum asetat bir miktar saf su içerisinde çözülür. Üzerine %99,5'lik glacial asetik asitten 1,435 mL (5mmol) eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

2.2.4. Mobil Faz

Solvent: A 0,050 M asetat tamponu / tetrahidrofuran (99/1) pH: 7,2

Solvent B: metanol: 0,50 M asetat tamponu (90:10) Ph: 9,5

2.2.5. Cihaz Koşulları

Akış Hızı ve Enjeksiyon Hacmi: 1 ml/dak. - 20 µl. Dalga Boyu: 340 nm uyarma, 450 nm emisyon FLD. Tablo 5.1’de mobil faz gradient programı gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Mobil faz gradient programı

No	Zaman (dk)	A (%)	B (%)	Akış (ml/dk)
1	0	50	50	1
2	0	75	25	1
3	8	75	25	1
4	12	66,7	33,3	1
5	25	50	50	1
6	30	0	100	1
7	35	66,7	33,3	1
8	40	75	25	1

2.2.6. Standart Hazırlama

Her bir biyojen amin standardından; 10 mg alınıp 10 ml ye 0,10 M HCl çözeltisi ile tamamlanarak 1mL’de 1mg biyojen amin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. 10 ppm 25 ml olacak şekilde biyojen aminlerden ara stok çözeltisi oluşturulmuştur. Hazırlanan stok biyojen amin çözeltilerinden alınarak 1, 5, 10, 25, 50 mg/L olacak şekilde destile su ile seyreltilmiştir.

2.2.7. Numune ve Standart Çalışma

0,45 mikron filtreden süzölmüş olan şaraplardan 100 µL örnek alınarak üzerine 250 µL borat tamponu ve 100 µL OPA eklenmiş olup 30 sn vortekslenmiş ve hiç beklemeden 20 µL cihaza enjekte edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Piyasadan alınan 10 farklı meyve şarabı örnekleri HPLC cihazında biyojen amin içerikleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Örnek şaraplarda histamin, putresin, tiramin ve kadaverin değerleri incelenmiştir. Analiz sonuçları Tablo 3.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Şaraplarda tespit edilen biyojen aminler (mg/L)

Şarap Örnekleri	Histamin	Putresin	Tiramin	Kadaverin	Feniletilamin	Triptamin
Nar Şarabı 1	-	10,09	6,93	-	-	-
Karadut Şarabı 1	-	11,91	10,52	-	-	-
Karadut Şarabı 2	-	8,35	33,56	-	-	-
Vişne Şarabı 1	3,69	11,56	32,32	-	-	-
Vişne Şarabı 2	1,81	11,02	10,61	-	-	-
Kavun Şarabı 1	-	10,08	22,70	-	-	-
Çilek Şarabı 1	-	8,98	18,50	-	-	-
Çilek Şarabı 2	5,68	11,72	28,95	-	-	-
Yaban Mersini Şarabı 1	-	4,60	7,02	-	-	-
Böğürtlen Şarabı 1	-	10,76	43,20	-	-	-

Ülkemizde şarapta biyojen aminlerle ilgili bir sınır değeri bulunmamaktadır. Ancak Türk Gıda Kodeksine göre şaraplarda histamin için 10 ppm limit değeri getirilmiştir. Şarapta biyojen aminlerle ilgili yasal düzenlemelerin az olması bu ürünün ithalat ve ihracatını zorlaştırmaktadır (Anlı ve ark., 2006; Zhijun ve ark.,2007).

23/09/2002 tarih ve 24885 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan “TGK Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Miktarlarının Belirlenmesi Hakkında

Tebliğ” de şaraplarda bozulma indikatörü olarak açıklanan histamin için 10 mg/kg sınır değeri vardır (Anonim 2002). 17/05/2008 tarih ve 26879 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren “TGK Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (2008/26) ile bu değer mevzuattan kaldırılmıştır (Anonim 2008).

Türkiye’de konuyla ilgili tek yasal düzenleme 29/12/2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren TGK Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği olup balık ve balık ürünlerinde histamin için limitleri belirtmektedir (Anonim 2011).

Biyojen aminler içinde en fazla toksik etkiye sahip olan histaminin Türk Gıda Kodeksinde belirtilen 10 mg/L sınır değerinin oldukça altında olduğu görülmektedir. Öğün başına 40 mg biyojen amin alımı potansiyel toksik olarak rapor edilmiştir. Şarapların biyojen amin düzeyleri ile ilgili şimdilik Avrupa veya Amerika’da belirli bir sınırlama yoktur ancak bu yönde çalışmalar devam etmektedir.

Bazı ülkeler ithal edilen şaraplar için kendi sınırlamalarını koymuşlardır. Genel olarak, şarap üreticileri biyojenik amin miktarının 50-100 mg/L üstünde olması durumunda, aroma üzerinde etkili olduğunu iddia etmektedirler. Bazı Avrupa ülkelerinde, şaraplarda bulunan histamin için tavsiye edilen maksimum sınır değerleri Almanya’da 2 mg/L, Hollanda’da 4 mg/L, Belçika’da 6 mg/L, Fransa’da 8 mg/L ve İsviçre ve Avusturya’da 10 mg/L olarak belirtilmiştir (Gloria ve ark.,1998; Lehtonen,1996).

8-40 mg histamin alımı, düşük, 40-100 mg histamin alımı,orta, 100 mg’ın üzerinde histamin alımı ise şiddetli bir gıda zehirlenmesine neden olmaktadır (Parente ve ark.,2001).

Biyojen aminlerin toksisitesi ile ilgili kesin sınır değeri belirlemek çok zordur. Tüketilen gıdanın çeşidi, miktarı ve biyojen amin içeriği gibi faktörler ile inhibitörlerin varlığı biyojen aminlerin toksisitesi ile ilgili limitlerin tespit edilmesini güçleştirmektedir. Ancak ülkemizde, gıdalarda bulunabilecek histamin miktarıyla ilgili sınır değerleri 10-100 mg/100g gıda olarak belirlenmiştir. Bu limitler şaraplar için 2-10 mg/L olarak tavsiye edilmektedir. Toksikasyonun başladığı eşik sınırları, tiramin için 100-800 mg/kg ve feniletilamin için 30 mg/kg gıda olarak bildirilmektedir (Izquierdo ve ark., 1996).

Yaptığımız çalışmada, meyve şarapları örneklerinde incelenen biyojen amin içerikleri sınır değerlerinin altında çıkmıştır. Bu sonuca göre analizini yaptığımız şarapların her hangi bir tehlike oluşturmadağı görülmüştür.

Şarapta bulunan tiramin (2,5 mg/100 mL) ve histamin (beyaz şaraplarda 100-500mg/100ml ve kırmızı şaraplarda 2-2,2 mg/100 mL) gibi biyojen aminler sulu

çözeltilerde barsakta parçalanabildiği halde, ortamda alkol bulunması halinde toksik etki yapmaktadırlar. Kırmızı şarap tüketilerek alınan biyojen aminlerin sınır değeri histamin için 50 mg/ L, ve tiramin için 600 mg/L'dir. Beyaz şaraplarda ki sınır değeri histamin için 33mg/L ve tiramin için ise 400 mg/L'dir (Acar ve Uygun 1998).

Yapılan araştırmalar şaraplarda biyojen amin bulunmasının sırada biyojen aminlerin varlığı, alkol fermentasyonu ve malolaktik fermentasyon sırasında mayalar tarafından oluşturulması gibi üç ana nedene bağlı olduğunu ortaya koymaktadır (Gürbüz 2002).

Şaraplarda sıklıkla tespit edilen biyojen amin histamindir. Bu durum şarap üretiminin hijyenik açıdan optimum şartlarda yapılmadığının bir göstergesi olarak belirtilmiştir. Çeşitli şaraplarda yapılan ilk çalışmalarda, Avrupa, Amerika ve Güney Afrika bölgelerinde kırmızı şaraplarda beyaz şaraplardan daha fazla oranda biyojen amin bulunmuştur (Isabel ve ark., 2006).

Portekiz'de yapılan çalışmada Portekiz beyaz şaraplarının çoğunun güvenli olduğu görülmektedir. Analiz edilen şaraplardan sadece % 7'sinde 8 mg/Lt'den fazla tiramin ve histamin konsantrasyonları çıkmıştır. Yapılan başka bir çalışmada çalışmada 5 farklı üzüm kullanılarak elde edilen organik ve organik olmayan şarap örneklerinde biyojen amin analizleri yapılmıştır. Örneklerde en yüksek miktardan, en düşük miktara doğru sırasıyla putresin, histamin, etilamin, metilamin, agmatin, tiramin, kadaverin, triptamin bulunmuştur. 2-fenilettilamin örneklerin hiçbirinde tespit edilememiştir. Organik şaraplarda putresin 5,55 mg/L, etilamin 0,825 mg/L ve histamin 0,628 mg/L, organik olmayan şaraplarda putresin 3,68 mg/L, etilamin 1,14 mg/L ve histamin 0,662 mg/L olarak tespit edilmiştir (Yıldırım ve ark., 2007).

Şili'de değişik üzüm çeşitlerinden elde edilen şaraplarda biyojen amin miktarını araştırdıkları çalışmada biyojen amin içeriğinin 2.19-65.09 mg/L arasında ve tüm şaraplarda, putresin miktarının diğer biyojen aminlerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Aedo ve ark., 2012).

OPA türevleri kullanılarak HPLC cihazında yapılan bir çalışmada Rioja kırmızı şaraplarında biyojen amin analizleri gerçekleştirilmiştir. Ortalama 8,72 mg/L histamin, 4,98 mg/L tiramin, 32,97 mg/L putresin, 0,61 mg/L kadaverin bulunmuştur (Vazquez ve ark., 1998).

Geç hasat edilen üzümlerden elde edilen şaraplar incelenmiş. Bu üzümlerin asitliği daha düşük olduğu için, bu üzümlerden yapılan şarapların en yüksek biyojen amin miktarına sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Üren ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada dansil klorür türevlendirme ajanı olarak kullanılmış, 30 farklı kırmızı sarapta analizler gerçekleştirilmiş ve 9 farklı biyojen amin belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda histamin düzeyi 0-1,965 mg/L arasında bulunmuştur. Putresin en fazla 1,85 mg/L, kadaverin ise en fazla 5,92 mg/L olarak bulunmuştur (Anlı ve ark., 2004)

Avusturya beyaz şaraplarında yapılan bir çalışmada 10mg/L yi aşan amin içeren çok az şarap örneği olduğunu bildirmişlerdir. İsviçre şarapları üzerine yapılan çalışmada histamin miktarı 0,6 ila 21,1 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. Avrupa ve Amerika üretimli şaraplarda yapılan bir başka çalışmada bu değer 30 mg/L ye kadar çıkmıştır. Şili’de değişik üzüm çeşitlerinden elde edilen şaraplarda biyojen amin varlığını araştırdıkları çalışmada biyojen amin içeriğinin 2,19-65,09 mg/L arasında değiştiğini ve tüm şaraplarda en yüksek biyojen aminin putresine ait olduğunu bildirmişlerdir. New York şarapları incelenerek yapılan bir çalışmada histaminin yanısıra putresin, kadaverin ve tiraminin de belirlendiğini ve bazı şaraplarda 108,3 mg/L den daha fazla tespit edilen kadaverinin, histaminden kaynaklanan reaksiyonların artmasına neden olduğunu ifade edilmiştir (Lehtonen., 1996).

Histamin miktarı beyaz şaraplarda çoğunlukla 1 mg/L iken, kırmızı şaraplarda 30 mg/L ‘ye kadar çıkabilmektedir, şarapta bu bileşiklerin varlığı üzerine yapılan çalışmalar şarabın yalnızca 2 mg/L’ye kadar histamin içermesi gerektiğini göstermektedir (Gürbüz, 2002).

Yapılan bir araştırmada beyaz şaraplardaki ortalama histamin konsantrasyonu 0,26 mg/L, tiramin 0,6 mg/L, putresin 1,1 mg/L ve kadaverin de 0,3 mg/L olarak belirtilmiştir (Lehtonen., 1996).

3.1. Histamin

Histamin L-histidin dekarboksilaz aktivitesi sonucu histidin aminoasidinden sentezlenir. Diaminoksidaz (DAO) aktivitesiyle de oksidatif deaminasyona uğrayarak metabolize olabilir. Beslenmeyle yüksek dozda alınan histamin ve DAO’nun düşük aktivite göstermesi kanda yüksek histamin seviyelerine neden olur. Bazı ilaçlar ve alkol DAO aktivitesini azaltabilir (EFSA 2011).

Histamin insan vücudunda önemsiz düzeylerde bulunur. Nörotransmisyon ve vasküler geçirgenlik gibi kilit fonksiyonlara katılır. Histamin zehirlenmesinin semptomları baş ağrısı, burun akıntısı, bronş spazmı, taşikardi, düşük tansiyon, ödem, ürtiker, kusma ve

astım olabilmektedir. Biyojen aminlerin vücut sıcaklığının dengelenmesi, mide hacmi, mide pH'ı ve beyinsel aktivitelerin düzenlenmesi ile ilgili de görevleri vardır (Smit 2007).

Yaptığımız çalışmada piyasadan alınan meyve şarapları örneklerinde araştırılan biyojen aminlerden histamin konsantrasyonları araştırılmıştır. Histamin vişne ve çilek şaraplarında görülmüştür. Tespit edilen biyojen aminler içinde en düşük histamin değeri 1,81 mg/L ile vişne şarabında, en yüksek değer ise 5,86 mg/L ile çilek şarabında görülmüştür.

3.2. Putresin

Hayvanlarda ve mikroorganizmalarda putresin oluşumu için ornitin aminoasidi ve ornitin dekarboksilaz enzimi gereklidir. Putresin; spermidin ve spermin gibi fizyolojik poliaminlerin öncülü rolündedir ve bunlar hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve tümör oluşumunda rolü vardır. Putresinin farmakolojik etkileri histamin ve tiramine göre çok düşük seviyededir. Bilinen etkileri düşük tansiyon, düşük kalp ritmi ve çene kilitlenmesidir. Putresinin gıdalarla alımının en önemli etkisi ilkin histamin olmak üzere diğer biyojen aminlerin toksisitesini arttırmasıdır. Öte yandan nitrit ile reaksiyona girerek kanserojen olduğu bilinen nitrosaminlere dönüşmesidir (EFSA, 2011).

Yaptığımız çalışmada putresin bütün şarap örneklerinde tespit edilmiştir. Putresin yaban mersini şarabında 4,60 mg/L ile en düşük, karadut şarabında 11,91 mg/L ile en yüksek seviyede tespit edilmiştir.

3.3. Tiramin

Tiramin, fenitetilamin ve triptamin gibi iz aminler olarak bilinmektedir. Tiramin tirozin dekarboksilasyonu sonucu tiramin oluşmaktadır. Tiramin diğer iz aminler gibi şizofreni, depresyon, dikkat eksikliği ve Parkinson hastalığı gibi rahatsızlıklarda rol oynadığı düşünülmektedir (EFSA, 2011).

Tiramin de yine putresin gibi bütün şarap örneklerinde tespit edilmiştir. En düşük tiramin değeri 6,94 mg/L ile nar şarabında, en yüksek tiramin değeri 43,20 mg/L ile böğürtlen şarabında tespit edilmiştir.

3.4. Kadaverin, Feniletilamin ve Triptamin

Lisin aminoasidi, lisindekarboksilaz ile dekarboksile olarak kadaverin meydana getirir. Feniletilamin ve triptamin sırasıyla fenilalanin ve triptofan aminoasitlerinin dekarboksilasyonu sonucu meydana gelmektedir. Kadaverinin diamin ve poliaminlerin oluşumuna katkısı vardır. Bazı sistemlerde pasif difüzyon yoluyla putresin ile yer değiştirebildiği bildirilmiştir Feniletilamin ve triptaminin vazokonstriksiyon etkisi yüksek tansiyona yol açmaktadır. Baş ağrısı, hızlı solunum, kusma ve benzeri etkileri de kaydedilmiştir (EFSA, 2011).

Kadaverin, feniletilamin ve triptamin incelediğimiz meyve şaraplarında tespit edilmemiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada toksikolojik etkileri bilinen biyojen aminlerden histamin, tiramin ve feniletilaminin ile sanitasyon indikatörü olabileceği düşünülen biyojen aminlerden putresin, triptamin ve kadaverin değerleri HPLC cihazı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bütün şarap örneklerinde putresin ve tiramin tespit edilmiş, kadaverin, feniletilamin ve triptamin tespit edilememiştir. Histamin ise sadece vişne ve çilek şaraplarında belirlenmiştir.

Böğürtlen şarabında tespit edilen 43,20 mg/L tiramin değeri şarap örnekleri arasında en yüksek seviye olarak tespit edilmiştir. Toplam biyojen amin içeriği 53,96 mg/L ile böğürtlen şarabında en yüksek seviyede, 11,62 mg/L ile yaban mersini şarabında en düşük seviyede tespit edilmiştir.

Biyojen aminler barsakta parçalanabildiği halde, ortamda alkol bulunması halinde toksik etki yapmaktadırlar. Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri göz önüne bulundurulduğunda şaraplardaki biyojen aminlerin tespit edilmesinin önemi de anlaşılmaktadır.

Ülkemizde gıdalarda bulunan biyojen aminlerde histamin dışında belirlenmiş yasal üst limit değeri bulunmamaktadır. Gerçekleştirdiğimiz analizlerde meyve şaraplarında belirlenen biyojen amin miktarları insan sağlığını olumsuz etkileyecek seviyelerde bulunmamıştır.

Yapılan incelemeler sonucunda şaraplarda biyojen amin konsantrasyonları hakkında elde edilen farklı sonuçlarla kesin bir yargıya varmak zordur. Ancak Şaraplar arasında biyojen amin miktarlarının farklılıkları, şarabın proses aşamaları, kullanılan meyvenin cinsi ve hijyen koşullarına göre değişmekte olduğunu düşünmekteyiz.

Türkiye'de üretilen meyve şarapların biyojen amin içeriği konusunda daha net bir yargıya ulaşabilmek için örnek sayısı arttırılarak daha fazla sayıda çalışma yapılmasında yarar vardır. Tüketici sağlığını korunması adına, biyojen amin niceliğinin gıdalarda kontrol altında tutulması elzemdir.

KAYNAKLAR

- Acar, J., Uygun. Ü.,** 1998. Doğal toksik maddeler ve kontaminantlar. *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniv.Yayınları, 93:399-433.
- Aedo, K., Vega, M., Rodríguez, S.,** 2012. Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines. *Food Chemical Toxicology*, 50(2):2742-2750.
- Aflaki, F., Ghoulipour, Saemian, V., Salahinejad, M.,** 2014. A simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 6:1482-1487.
- Akman, A., Yazıcıoğlu, T.,** 1960. Şarap kimyası ve teknolojisi, *Anakara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 160:640-652.
- Amerine, M.A., Berg, H, Cruess, W.,** 1972. the technology of wine making westport CT: AVI Publishing.
- Anlı, R.E.,** 2005. Ansiklopedik Şarap Sözlüğü, *Kavaklıdere Eğitim Yayınları*, 256s., Ankara.
- Anlı, R.E., Vural, N., Demiray, S., Mert, B.,** 2006. Biogenic amine content of beers consumed in turkey and influence of storage conditions on biogenic amine formation. *Journal Insturement* 112(3):267-274.
- Anlı, R.E., Vural, N., Yilmaz, S. Vural, Y.H.,** 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 17:53-62.
- Anonim,** 2002. TKG Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Resmi Gazete, 24885.
- Anonim,** 2008. TKG Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Resmi Gazete, 26879.
- Anonim,** 2011. TKG Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, Resmi Gazete, 28157.
- Avrupa Topluluğu,** 2011. Controlling biogenic amines in traditional food fermentations in regional Europe
- Ayanoğlu, H., Kaşka , N.,** 1993. Preliminory results of local apricot adaptation studies in the mediterranean region of Turkey, 384:117-122
- Ayhan K., Kolsarici N., Özkan GA.,** 1999. The effect of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat Science* 53:183-188.

- Bauza T., Blaise A., Mestres., JP., Teissedre, PL, Daumar, F, Cobonis, JC., 1995.** Biogenic amines contents and their variation parameters in Cotes du Rhone, Wallee du Rhone and Provence wines. *Sciences des Aliments*, 15(4): 367-380.
- Bodmer, S., Imark, C., Kneubühl, M., 1999.** Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*, 48(2):296-300.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M, Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 2006.** Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry*, 96:43-47.
- Busto, O., J. Guasch., F. Borrull., 1996.** Biogenic amines in wines: a review of analytical methods. *J. Int. Sci. Vig. Vin*, 30(2):85-101.
- Cabaroglu, T., Cabaroglu, A., Baumes, R., Bayonove C., Lepoutre J.P., Günata Z., 1997.** Aroma composition of a white wine of *Vitis Vinifera L. Cv. Emir* as affected by skin contact. *Journal of Food Science*, 62(4):680-683.
- Cemeroğlu, B., 1982.** Meyve suyu üretim teknolojisi Ankara 309.
- Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Tangolar, S. Gündüz, M., 2000.** Bağcılıkta Üretim Hedefleri. T.Z.Y.M.O. V. *Teknik Kongresi*, Ankara, 2:645-678.
- Çolak H., Aksu H., 2002.** Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı ve amin oluşumunu etkileyen faktörler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 13:35-40.
- EFSA., 2011.** Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, *EFSA Journal*, 9:2903-2993.
- Galarce, O., Henriquez-Aedo, K., Peterssen, D., Pena-Farfal, C., Aranda, M., 2016.** Selective chromatographic method to determine the dynamic of biogenic amines during brewing process. *Food Analytical Methods*, 9:3385-3395.
- García-Villar, N., Saurina J., 2006.** High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. *Analytical Chemical*, 575(1):97-105.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., Özogul, F., 2016.** Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Front Microbiolgy*, 7:1-18.
- Gloria, M. B. A., Watson, B. T., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M. A., 1998.** A survey of biogenic amines in oregon pinot noir and cabernet sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3):279-282.
- Gürbüz, O., 2002.** Şarapta Biyojen Aminler. 27(2):85-91.

- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. Holzapfel, W.,** 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science and Technology*, 5(3):42-49.
- Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana- Nogues, M.T, Vidal-Carou, M.C.,** 1996. Ion-pair high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products, *Journal Agriculture Food Chemical*, 44(2):2710-2715.
- Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana- Nogues, M.T, Marine-Font, A., Vidal-Carou, M.C.,** 1997. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal Agriculture Food Chemical*, 45(2):2098-2102.
- Hwang, D.F., Chang, S. H., Shiau, C. Y., Cheng, C. C.,** 1995. Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning. *Journal Food Science*, 60(5): 926-928.
- Isabel M. P. L. V. O., Pinho, M.,** 2006. Biogenic amines in portuguese traditional foods and wines. *Journal of Food Protection*, 69(4):2293-2303
- Izquierdo-Pulido, M., Hernandez-Jover, T., Marine-Font, A., Vidal-Carou, MC.,** 1996. Biogenic amines in European beers. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 44(2):3159-63.
- Joosten, H., Northolt, L.,** 1987. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria, *Netherland. Milk Dairy*. 41:259-280.
- Joosten, H. M. L. J., Nunez, M.,** 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):1178-1181.
- Kalac, P., Svecova, S., Pelikanova, T.,** 2002. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry*, 77:349-351.
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Kim, D. H., Jo, C.,Yook, H. S., Byun, M. W.,** 2003. Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*, 68:80–84
- Kirschbaum, J., Meier A., Brückner H.,** 1999. Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization chromatographia.
- Lange, J., Wittmann, C.,** 2002. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(2):276-283.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A.,** 2010. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT-Food Science and Technology*, 43-20.

- Lehtonen, P.**, 1996. Determination of amines and amino acids in wine-a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(3):127-133.
- Leitao, M. C., Marques, A. P., Romao, M. V. S.**, 2005. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16(2):199-204.
- Lonvaud-Funel, A.**, 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(3):9-13.
- Loukou Z., Zotou A.**, 2003. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 996(2):103-113.
- Maijala, R.**, 1993. Histamine and tyramine production by lactobacillus strain subjected to external ph decrease. *Journal of Food Protection*, 57(2):259-262.
- Martín-Álvarez, P.J., Marcobal, A., Polo, C., Moreno-Arribas, M.V.**, 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*, 220(2):420-424.
- Maynard, L., Schenker V. J.**, 1996. Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro.
- Moret, S., Purcaro, G., Conte, S.L.**, 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market. *Food Chemistry*, 122:333-338.
- Obaedo, M.E., Ikenebomeh, M.J.**, 2009. Microbiology and production of banana (*Musasapientum*) wine. *Niger Journal Microbiology*, 23(1):1886-1891.
- Ordóñez, I., Ibanez, C., Torre, P., Barcina, Y.**, 1997. Formation of biogenic amines in idiazabol ewes milk cheese effect of ripening, pasteurization and starter, *Journal of Food Protection*, 60(11):1371-1375.
- Özoğul, F., Küley, E., Özoğul, Y.**, 2004. Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. *Ege Üniversitesi Su Ürün Dergisi*, 21(2):375-381.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gadrini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., Suzzi, G.**, 2001. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90:882-891.
- Petridis, K. D., Steinhart, H.**, 1996. Biogene amine in der hartkase produktion II. stufenkontroll-studie einer standardisierten emmentalerkase produktion. 5(2):142-146.
- Shalaby, A. R.**, 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7):675-690.

- Silla Santos, M. H.,** 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal Food Microbiology*, 29: 213–231.
- Sinell, H.J.,** 1978. Biogene Amino risikofaktoren in der fischhygiene. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 29:206-210.
- Smit, A. Y.,** 2007. “Evaluating the influence of winemaking on biogenic amine production by wine microorganisms”, *Master of Agri Sciences*, Stellenbosch University.
- Soufleros, E., Barrios, M.L., Bertrand, A.,** 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 266-278.
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L.,** 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54(2):460-470.
- Suzzi, G., Gardini. F.,** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal Food Microbiology*, 273(2):1-14.
- Tarantola, G.,** 1954. Separazione e identificazione cromatographica degli amino acid nei vitigni *Accademia Italy Vite Vino* 6(3):146-153.
- Tassoni, A., Germana, M. A., Bagni, N.,** 2004. Free and conjugated polyamine content in citrus sinensis osbeck, cultivar brasiliano, a navel orange at different maturation stages, *Food Chemistry*, 87:537-541.
- Ten Brink, B., Damink C., Joosten H. M. L. J.,** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 11:73-84.
- Torrea, D., Ancín Azpilicueta, C.,** 2001. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52:185-190.
- Üren, A., Yücel, U., Hocalar, B., Turantaş, F.,** 2001. Fermente ürünlerden peynir, şarap ve lahana turşularında biyojen amin miktarları, TÜBİTAK projesi, 70s.
- Vazquez, B., Iniguez, M., Larraina M., Gonzalez A.,** 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *Food Chemistry*, 49(3):229-234
- Vidal, M.C., Marin, A.,** 1983. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal Agriculture Food Chemical*, 12(1):25-59.
- Yankı, M.,** 2015. Şarabın Yıllandığı Toprak Anadolu. *Tarih Dergisi*, 08:64-73.

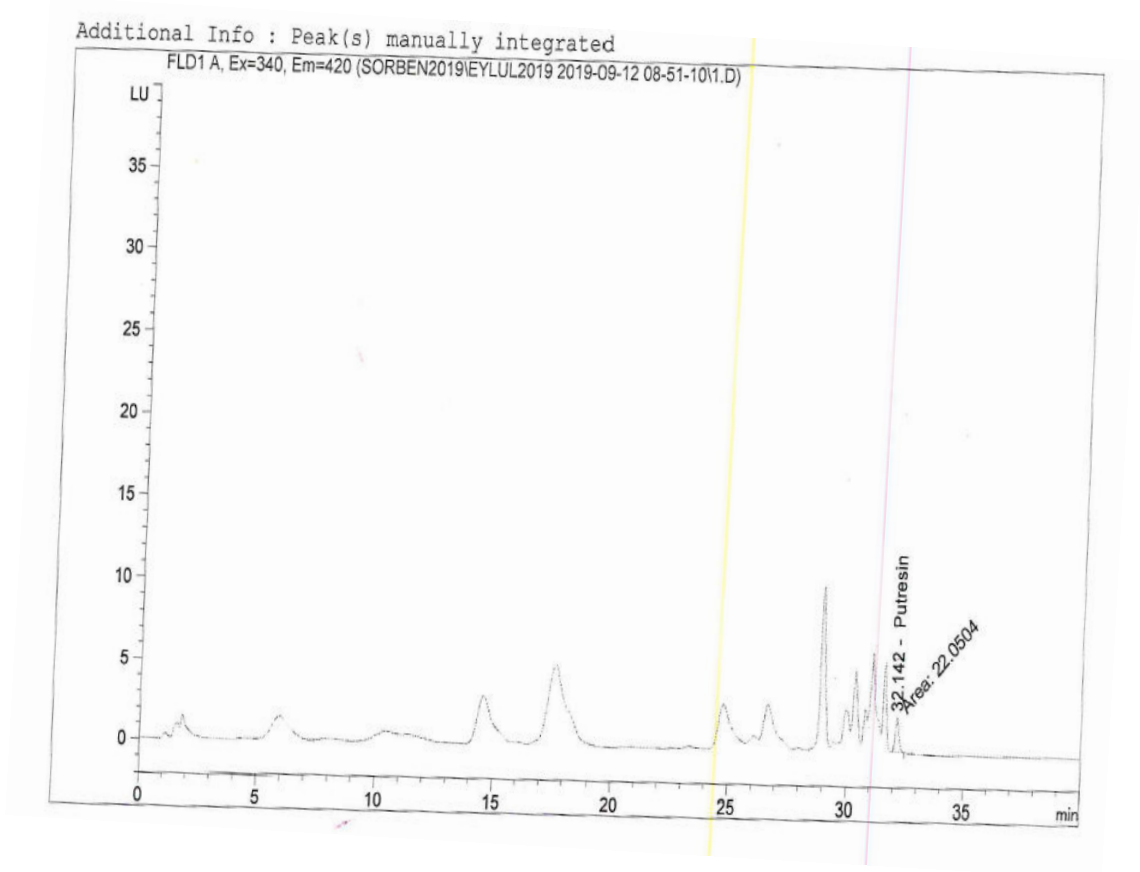
- Yerlikaya, P., Gökoğlu N.,** 2002. Gıdalarda biyojen aminler ve önemi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 12:25-30
- Yıldırım, H. K., Uren, A., Yucel, U.,** 2007. Evaluation of biogenic amines in organic and non organic wines by HPLC OPA derivatization. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (1):62-68.
- Zolou, A., Lokou, Z., Souflero, E., Stratis, I.,** 2003. Determination of biogenic amines in wines and beers by high performance liquid chromatography with column dansylation and ultraviolet detection. *Chromatographia*, 57:429-439



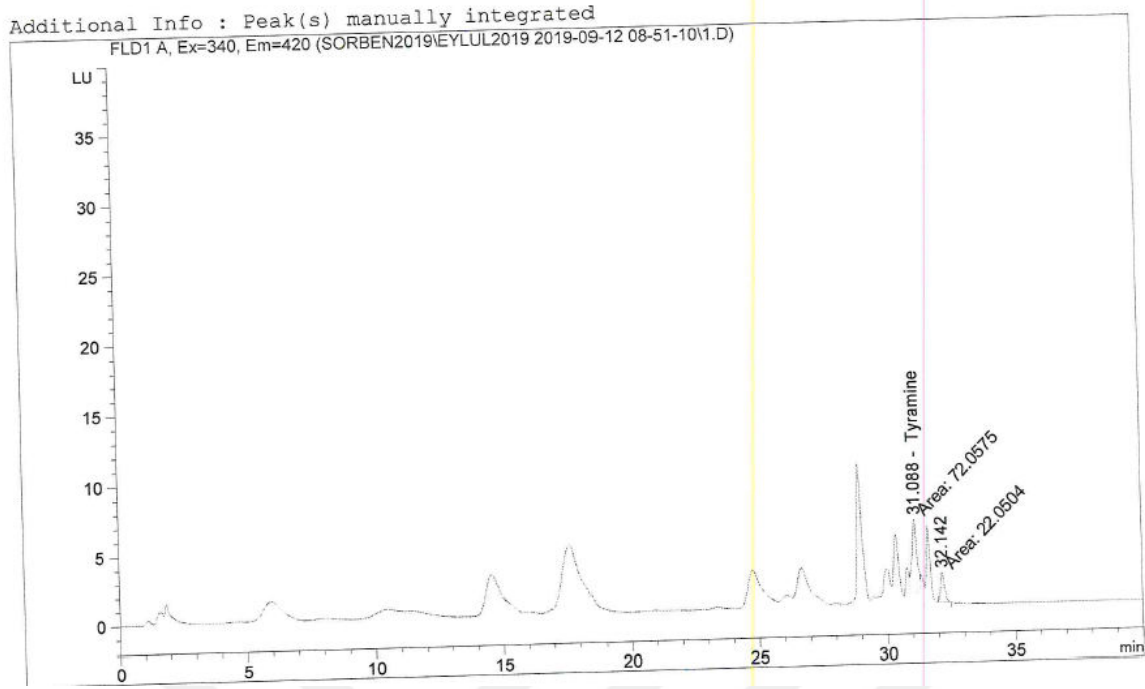


EKLER

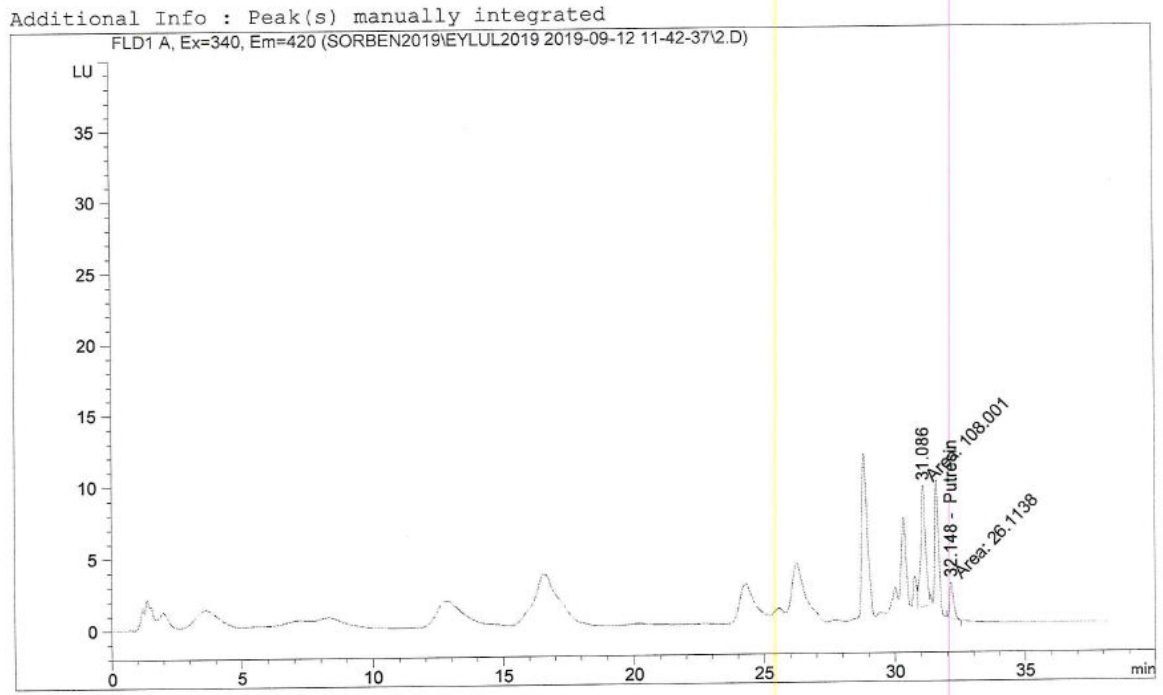
Biyogen aminlere ait kromatogramlar aşağıdaki şekillerde gşsterilmiştir.



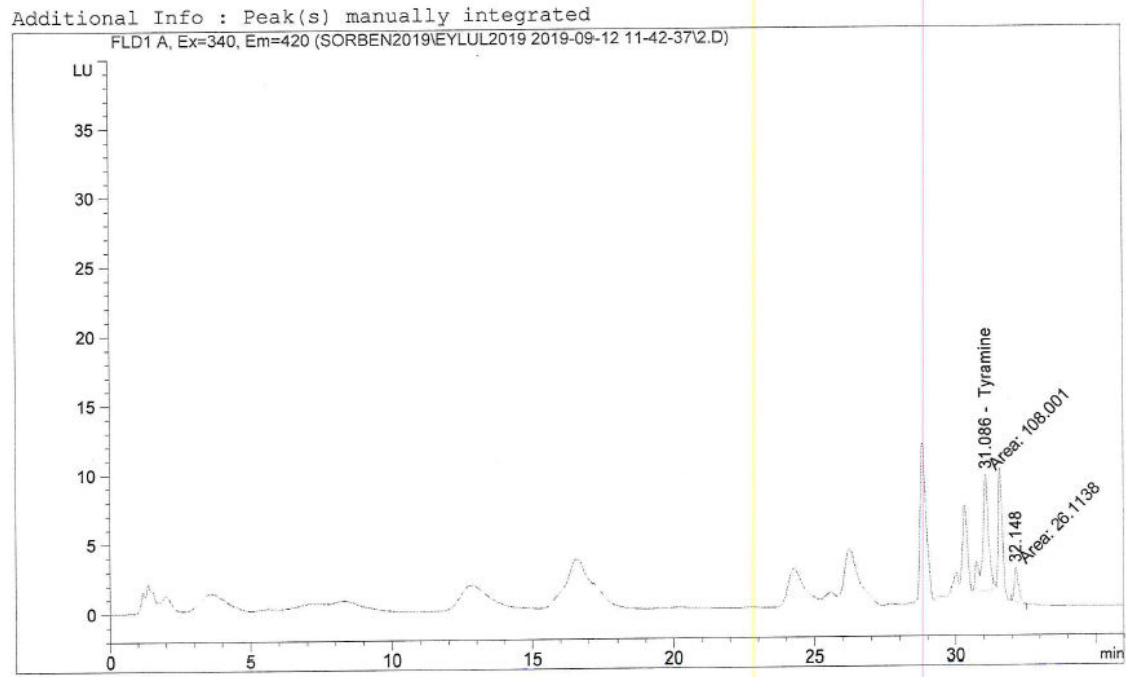
şekil 1.A. Nar şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



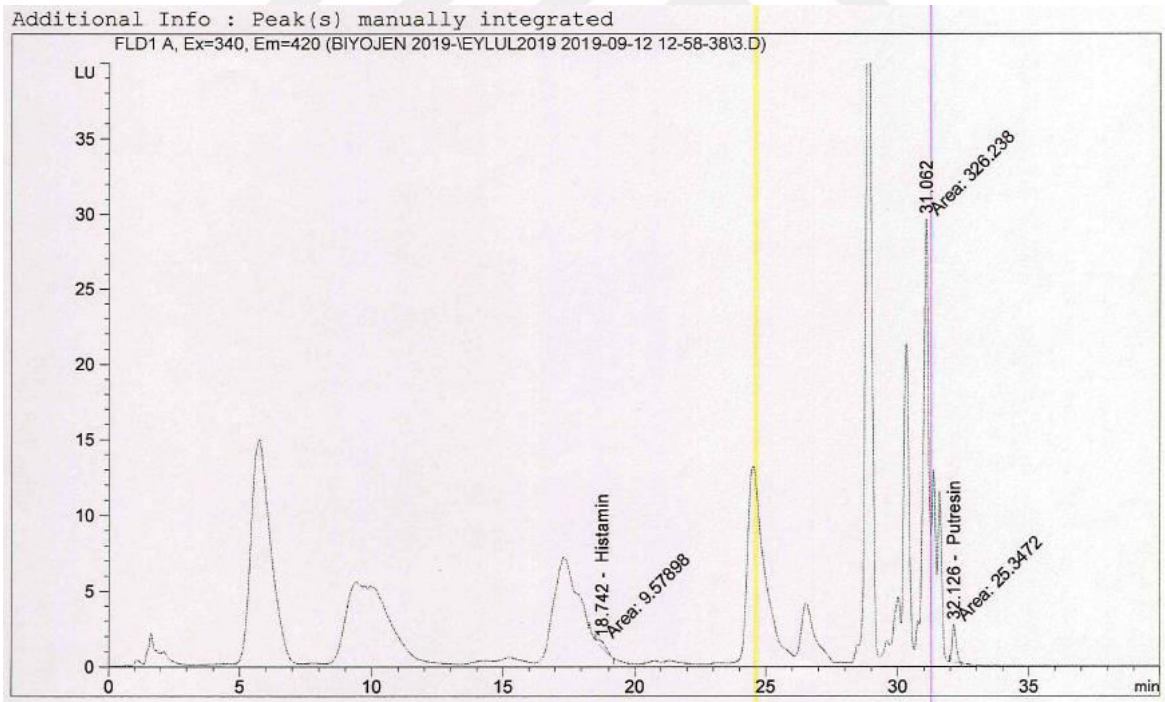
Şekil 2.A. Nar şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



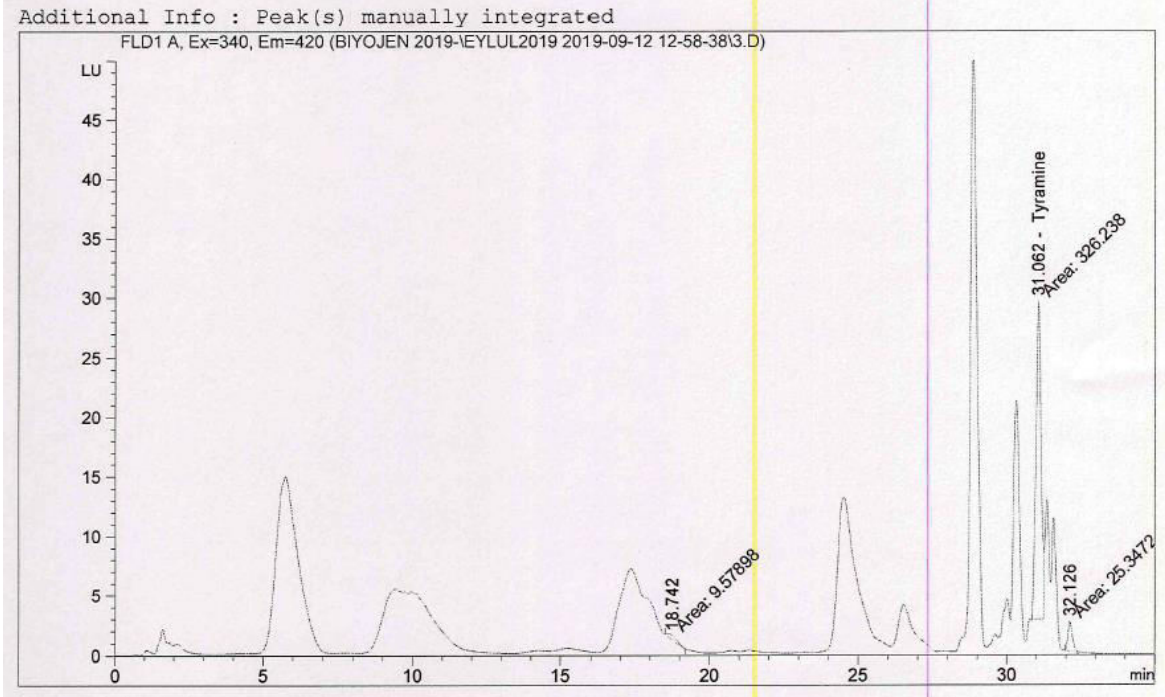
Şekil 3.A. Karadut şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



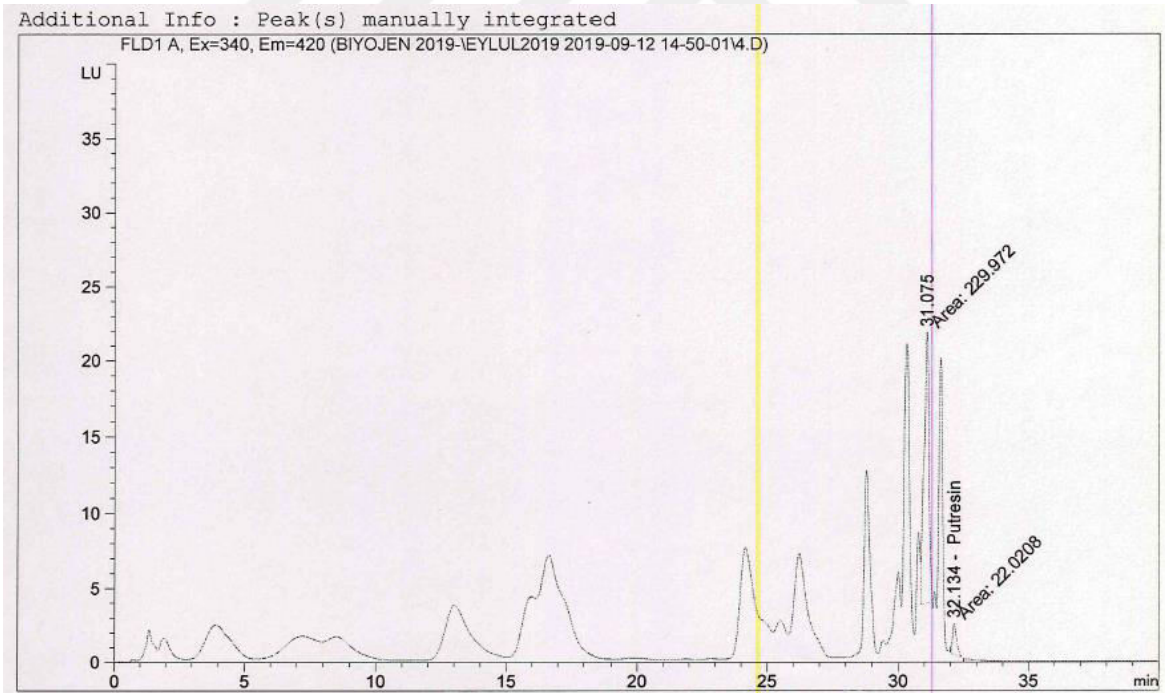
Şekil 4.A. Karadut şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



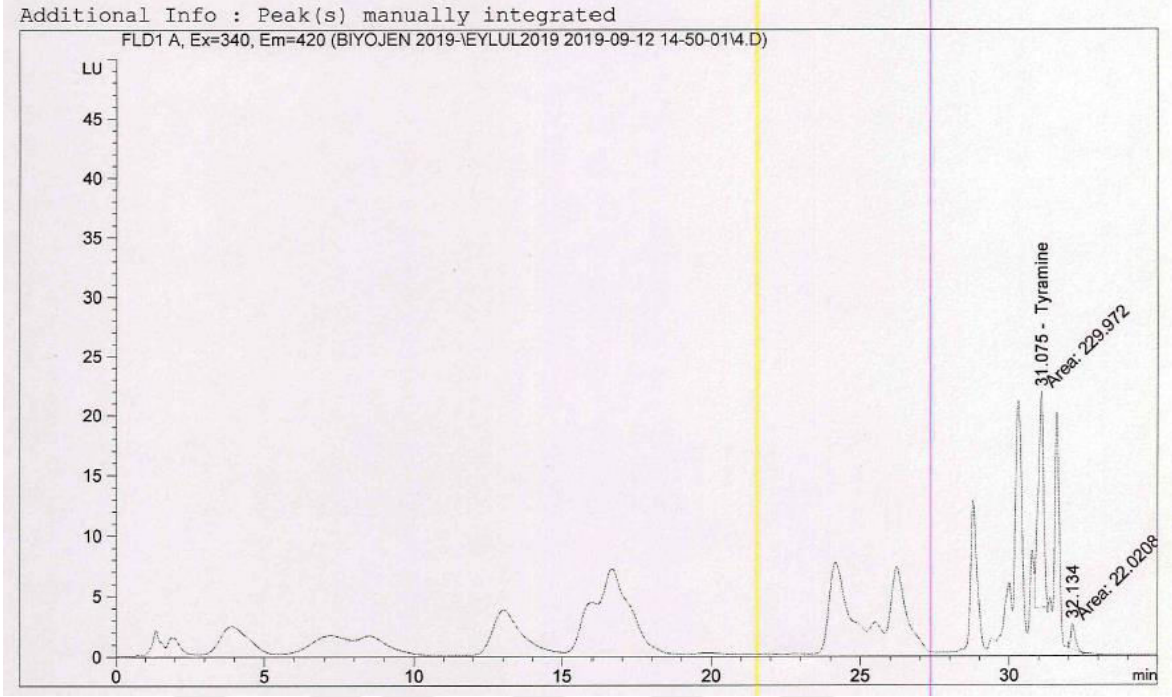
Şekil 5.A. Vişne şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



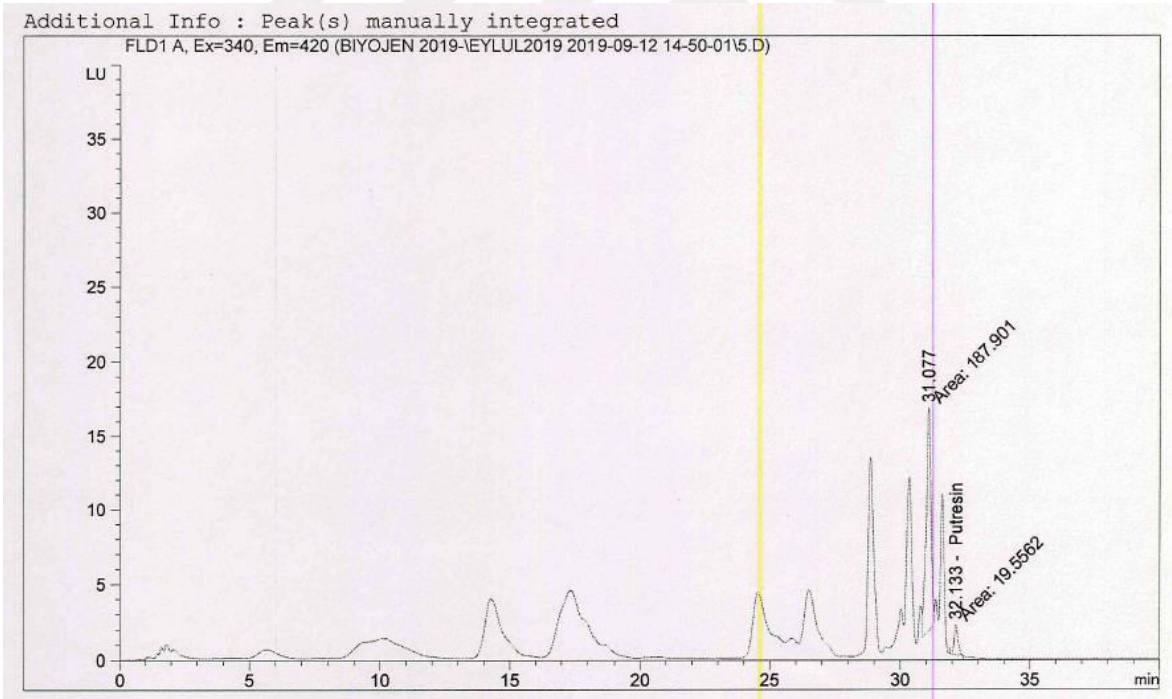
Şekil 6.A. Vişne şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



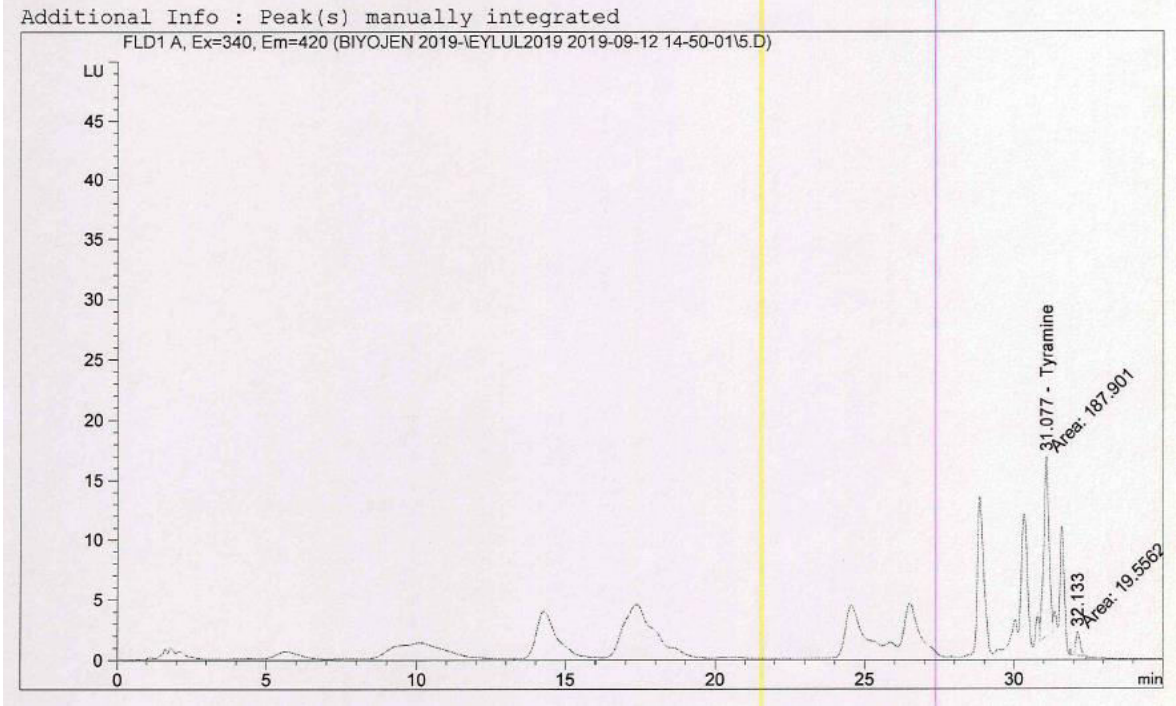
Şekil 7.A. Kavun şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



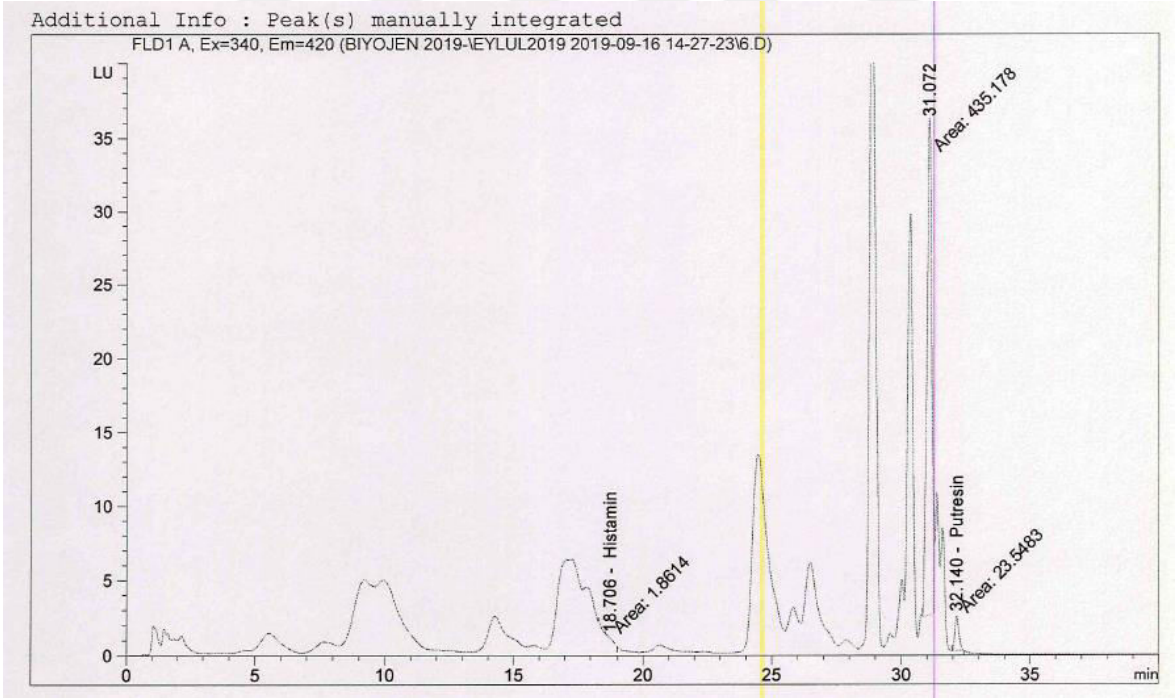
Şekil 8.A. Kavun şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



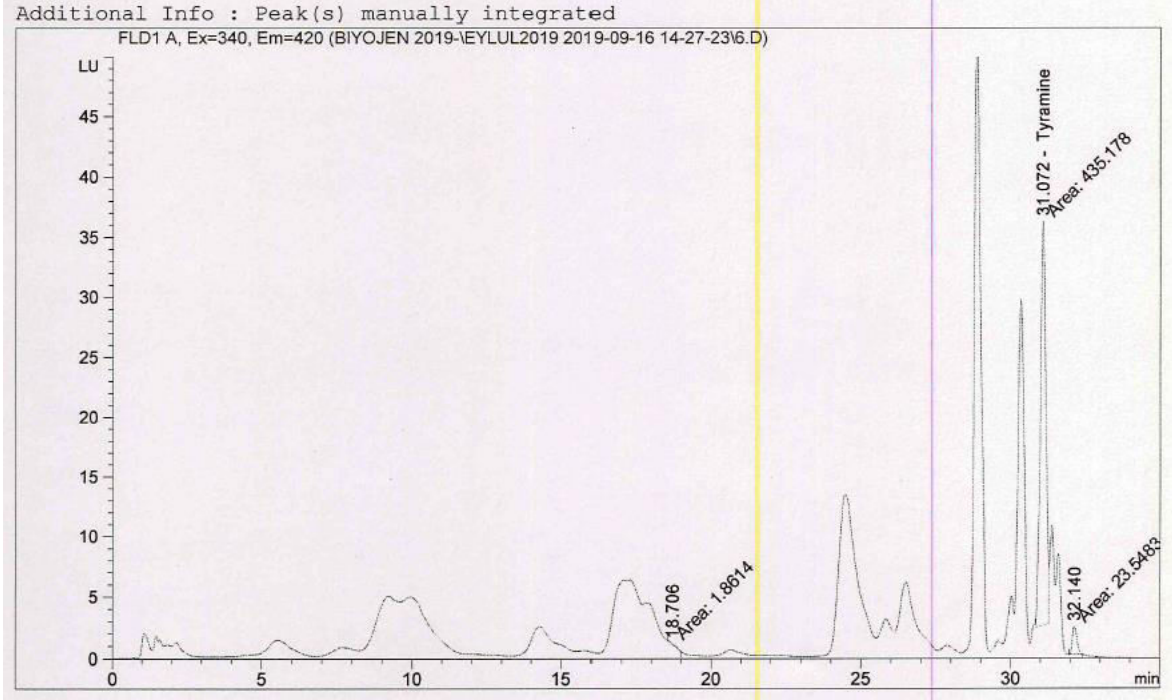
Şekil 9.A. Çilek şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



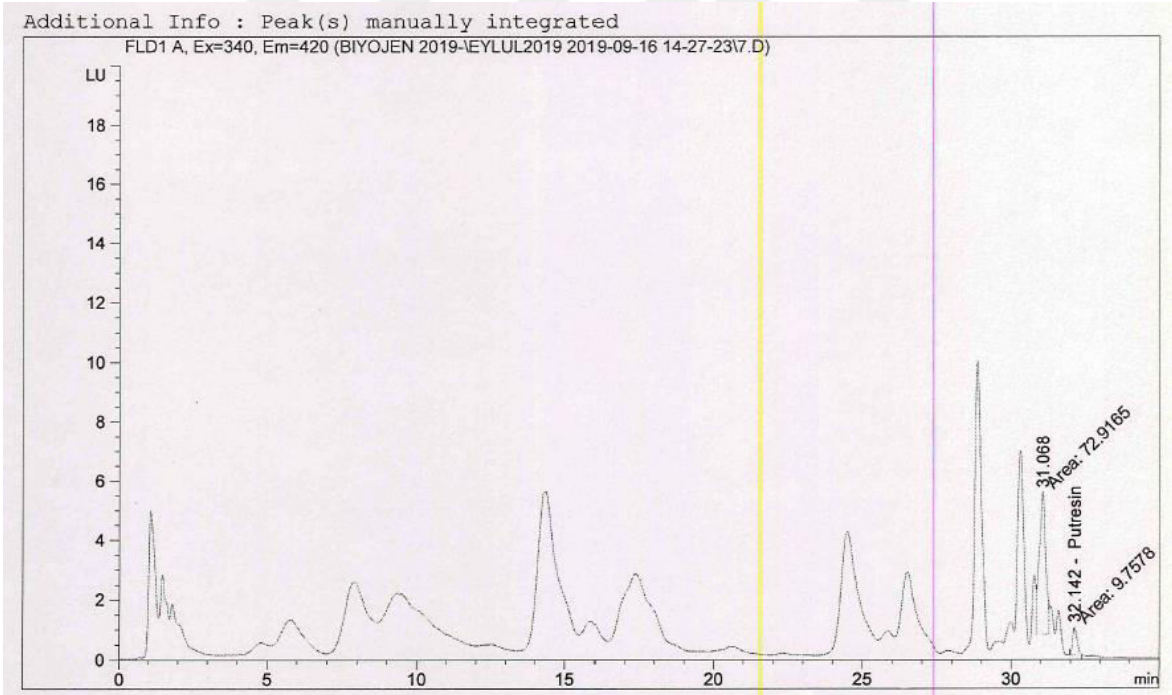
Şekil 10.A. Çilek şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



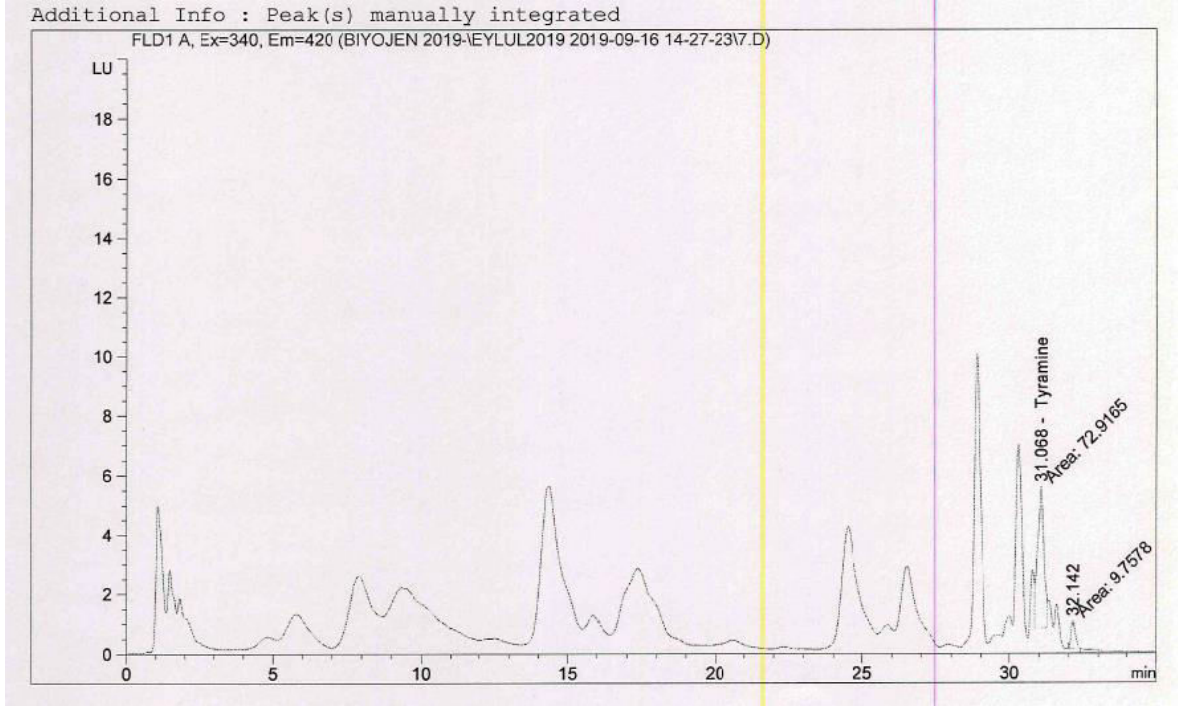
Şekil 11.A. Böğürtlen şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



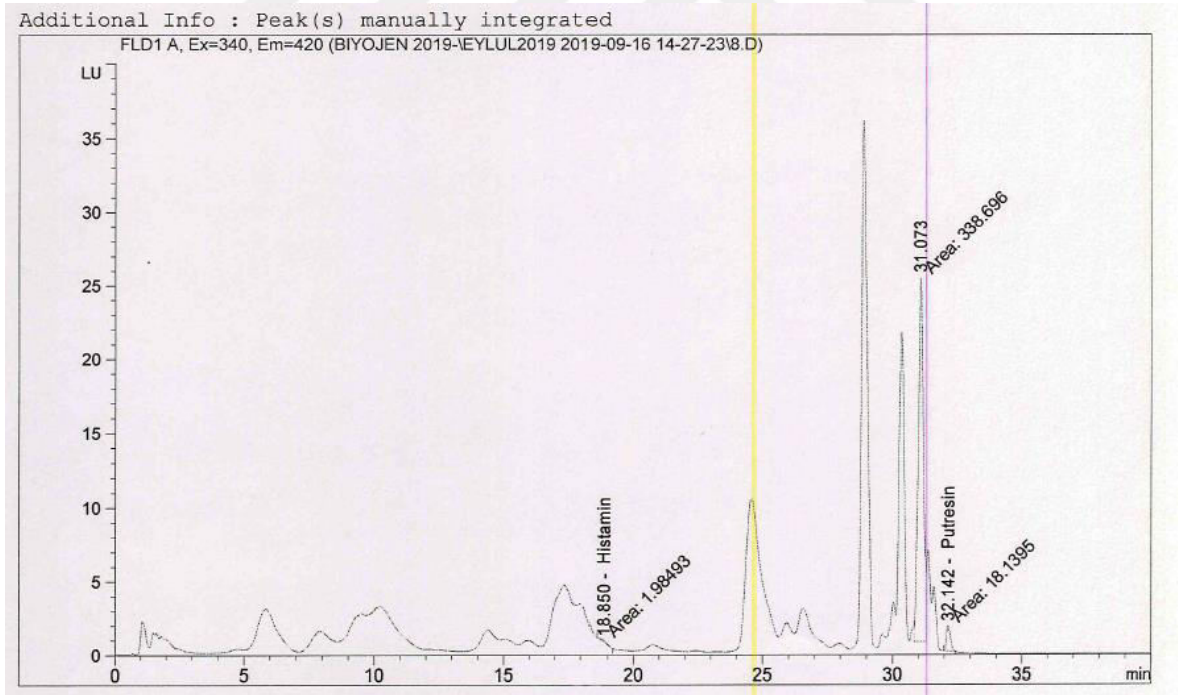
Şekil 12.A. Böğürtlen şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



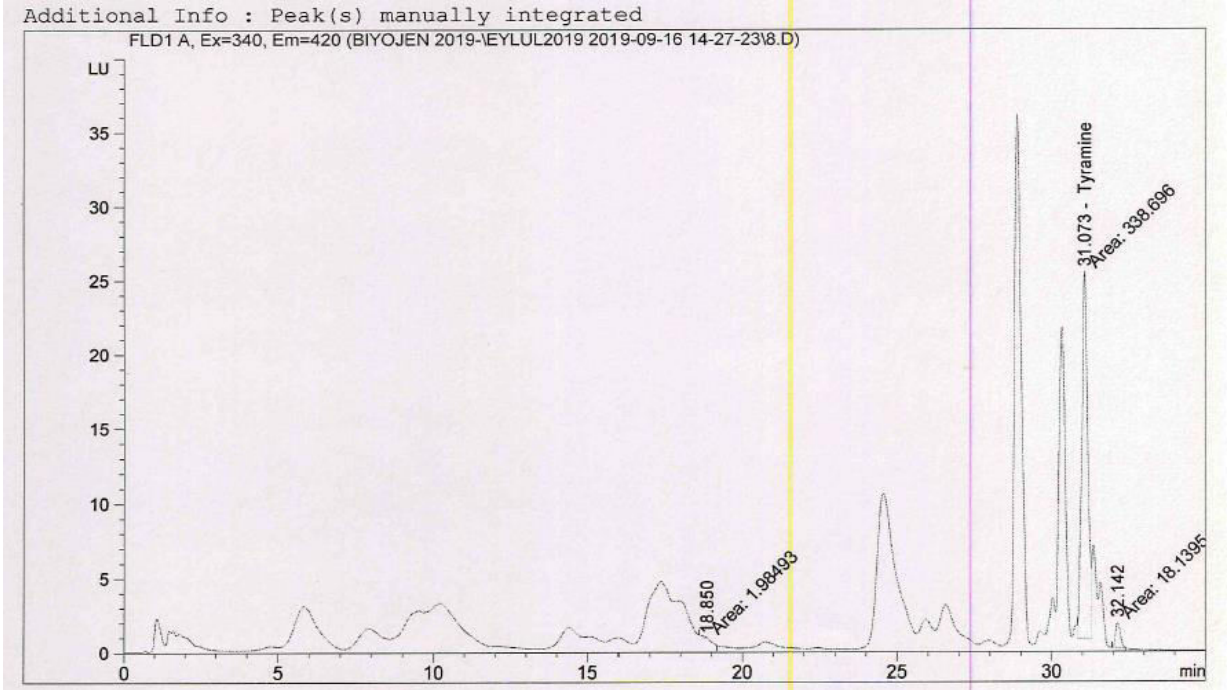
Şekil 13.A. Yaban mersini şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



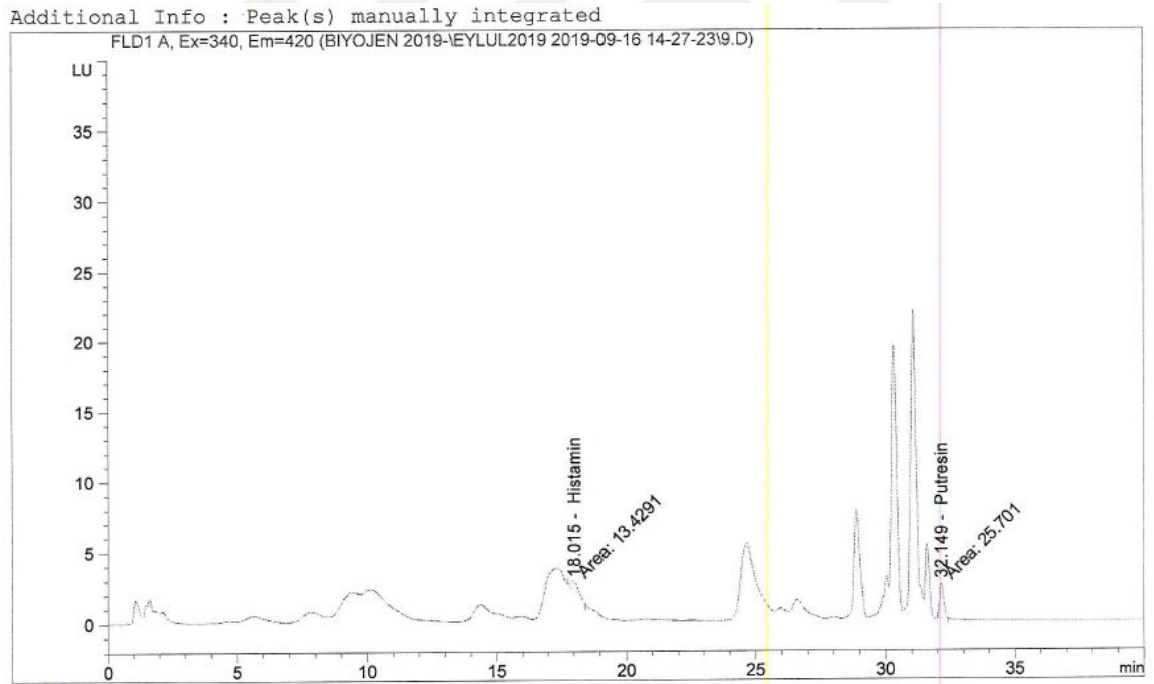
Şekil 14.A. Yaban mersini şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



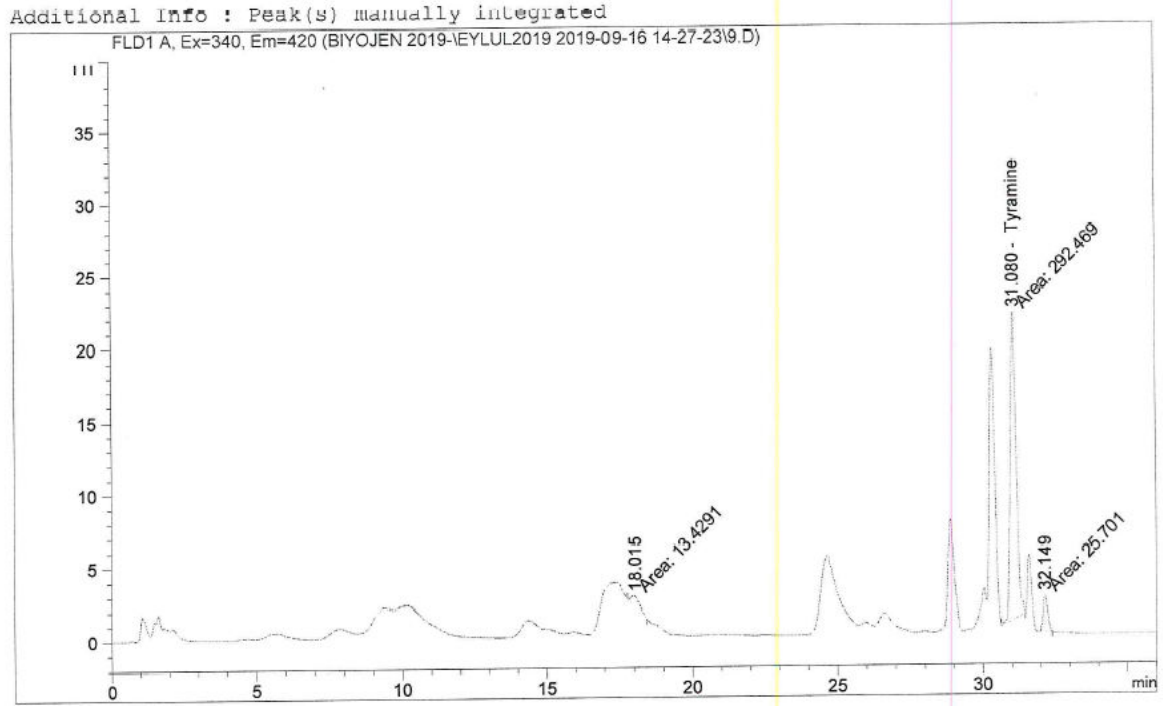
Şekil 15.A. Karadut (2) şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



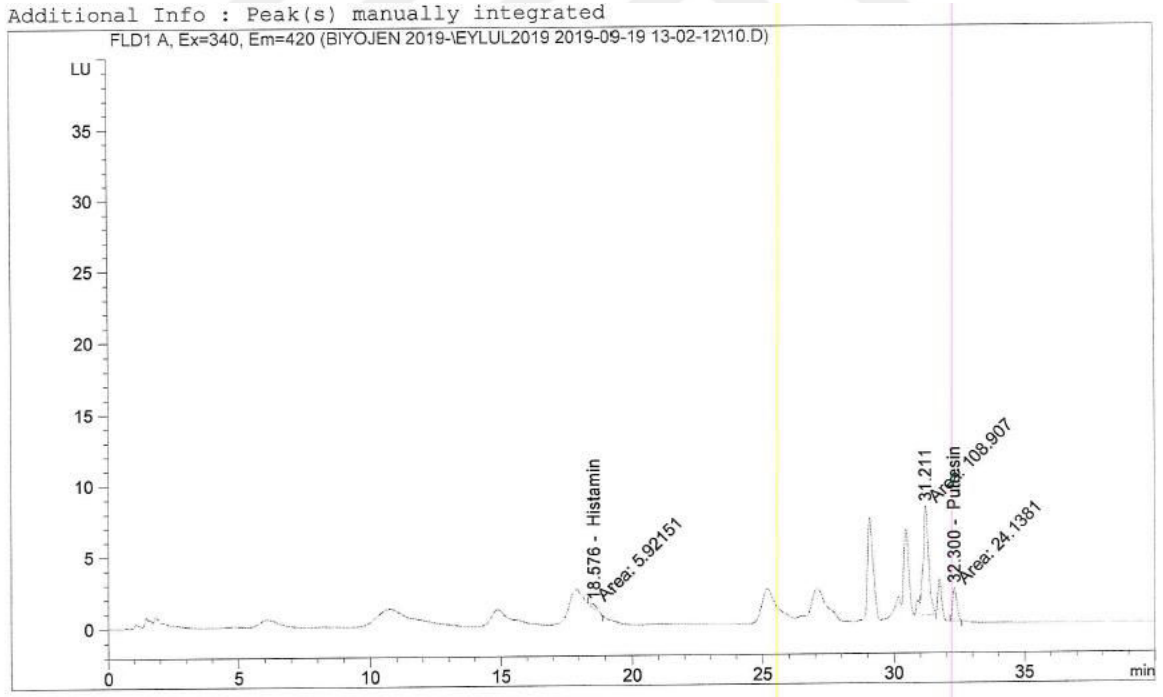
Şekil 16.A. Karadut (2) şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



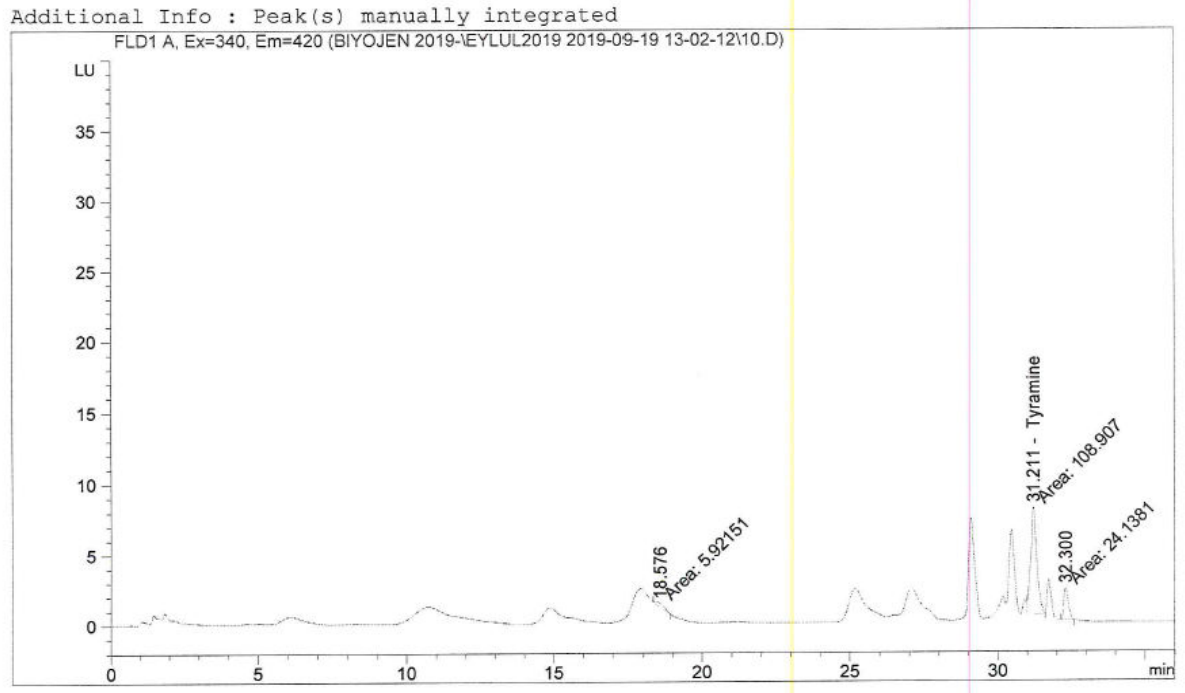
Şekil 17.A. Çilek (2) şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



Şekil 18.A. Çilek (2) şarabına ait tiramin ve kadaverin kromatogramı



Şekil 19.A. Vişne (2) şarabına ait histamin ve putresin kromatogramı



Şekil 20.A. Vişne (2) şarabına ait tir